

وزارت جهاد کشاورزی

سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی

موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور - مرکز تحقیقات شیلاتی آبهای دور

عنوان پروژه تحقیقاتی :

شناسایی جلبک های میکروسکوپی بومی دریای عمان و ارزیابی آنها به عنوان غذای زنده
در آبی پروری

مجری :

گیلان عطاران فریمان

شماره ثبت

وزارت جهاد کشاورزی

سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی

موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور- مرکز تحقیقات شیلاتی آبهای دور

عنوان پروژه : شناسایی جلبک های میکروسکوپی بومی دریای عمان و ارزیابی آنها به

عنوان غذای زنده در آبی پروری

شماره مصوب پروژه : ۸۷۰۰۹-۱۲-۲۸-۲

نام و نام خانوادگی نگارنده/ نگارندگان : گیلان عطاران فریمان

نام و نام خانوادگی مجری مسئول (اختصاص به پروژه ها و طرح های ملی و مشترک دارد) :

نام و نام خانوادگی مجری / مجریان : گیلان عطاران فریمان

نام و نام خانوادگی همکار(ان) : مریم فلاحی - علی موسوی گلسفید - ملیحه سنجرانی -

محمد رضا آذینی - شراره خدای - سلیم جدگال - مرحوم شهید علی رضا خواه - امام

بخش دلوکیان - محمد رفیق لعل شناس - منصور کرمی - فاطمه محسنی زاده - فرشته

اسلامی

نام و نام خانوادگی مشاور(ان) : Christofer J- Bolch

نام و نام خانوادگی ناظر(ان) : -

محل اجرا : استان سیستان و بلوچستان

تاریخ شروع : ۸۷/۱/۱

مدت اجرا : ۳ سال

ناشر : موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور

تاریخ انتشار : سال ۱۳۹۳

حق چاپ برای مؤلف محفوظ است . نقل مطالب ، تصاویر ، جداول ، منحنی ها و نمودارها

با ذکر مأخذ بلامانع است .

«سوابق طرح یا پروژه و مجری مسئول / مجری»

پروژه: شناسایی جلبک های میکروسکوپی بومی دریای عمان و ارزیابی آنها
به عنوان غذای زنده در آبرزی پروری

کد مصوب: ۸۷۰۰۹-۱۲-۷۸-۲

شماره ثبت (فروست): تاریخ:

با مسئولیت اجرایی سرکار خانم گیلان عطاران فریمان دارای مدرک
تحصیلی دکتری در رشته بیولوژی دریا می باشد.
پروژه توسط داوران منتخب بخش اکولوژی منابع آبی در تاریخ ۹۳/۵/۶

مورد ارزیابی و با رتبه عالی تأیید گردید.

در زمان اجرای پروژه، مجری در:

ستاد ☐ پژوهشکده ☐ مرکز ☒ ایستگاه ☐

با سمت عضو هیئت علمی در دانشگاه علوم دریانوردی چابهار مشغول
بوده است.

MINISTRY OF JIHAD - E - AGRICULTURE
AGRICULTURAL RESEARCH, EDUCATION & EXTENSION ORGANIZATION
IRANIAN FISHERIES RESEARCH ORGANIZATION -
Off-Shore Waters Research Center

Project Title :

Identification of Local Microalgae & their Evaluation as Live Food in Aquaculture from Oman Sea

Project Researcher :

Gilan Attaran-Fariman

Register NO.

**Ministry of Jihad – e – Agriculture
AGRICULTURAL RESEARCH, EDUCATION & EXTENSION ORGANIZATION
IRANIAN FISHERIES RESEARCH ORGANIZATION –
Off-Shore Waters Research Center**

Project Title : Identification of Local Microalgae & their Evaluation as Live Food in Aquaculture from Oman Sea

Approved Number: 2-78-12-87009

Author: Gilan Attaran-Fariman

Project Researcher : Gilan Attaran-Fariman

Collaborator(s) :

M.R.Azini,Sh.Khodami,M.Falahi,S.A.Mosavigolsefid,M.Sanjarani,S.Jadgal,A.Rezakhah,F.Eslami,F.Mohsenizadeh,M.R.Lalshenas,M.Karami,E.B.Dalokian

Advisor(s): Chrisofer j - Bolch

Supervisor: -

Location of execution : Sistan-O-Balouchestan province

Date of Beginning : 2009

Period of execution : 3 Years

Publisher : *Iranian Fisheries Research Organization*

Date of publishing : 2014

All Right Reserved . No Part of this Publication May be Reproduced or Transmitted without indicating the Original Reference

فهرست مندرجات

صفحه	عنوان*
۷	چکیده.....
۸	۱- مقدمه و مروری بر منابع.....
۱۴	۲- مواد و روش ها.....
۲۷	۳- نتایج.....
۱۳۷	۴- بحث و نتیجه گیری.....
۱۵۸	۵- نتیجه گیری :.....
۱۶۰	۶- پیشنهادات.....
۱۶۱	منابع.....

چکیده

میکروالگها نقش بسیار مهمی در آبرزی پروری ایفا می کنند و به عنوان غذای زنده در همه مراحل رشد نرمتان، بعضی از سخت پوستان، ماهیان و زئوپلانکتون ها مورد استفاده قرار می گیرند. در این پروژه با علم به این که گونه های فیتوپلانکتونی بومی هر منطقه، نیازهای تغذیه ای آبزیان پرورشی همان منطقه را بهتر پاسخگو است؛ برای اولین بار اقدام به جدا سازی، شناسایی و بررسی پتانسیل غذایی آن ها گردید. یکی دیگر از اهداف مهم پروژه حاضر ایجاد بانک فیتوپلانکتونی از گونه های بومی آب های جنوب کشور است.

در این تحقیق از آب دریای عمان در محدوده استان سیستان و بلوچستان نمونه برداری گردید و بعد از انتقال آن ها به آزمایشگاه، مراحل جداسازی و خالص کردن نمونه ها انجام شد. شناسایی گونه ها بر اساس مورفولوژی و آنالیزهای مولکولی با استفاده از استخراج rDNA، انجام PCR و تعیین توالی ژنی در قسمتی از ناحیه rDNA-LSU و مقایسه آن با گونه های مشابه موجود در بانک ژن انجام شد. به منظور بررسی پتانسیل غذایی، رشد نسبی، پروفیل اسیدهای چرب، میزان چربی کل، کربوهیدرات، پروتئین و برخی از ویتامین ها، ایزوله های خالص شده تعیین گردید. در مجموع ۲۵ گونه جدا و خالص گردید و توالی ژنی ۱۲ ایزوله، در بانک ژن ثبت شدند و همچنین مورد ارزیابی غذایی قرار گرفتند. از مهمترین این گونه ها *Dunaliella cf.* *Synechococcus sp.* *Bardawill*, *Isochrysis sp.* *Clorella cf. vulgaris*, *Ochromonas sp.* بودند.

در ایزوله های چابهار، میزان پروتئین بین ۲۷-۴۰٪ وزن خشک، کربوهیدرات ۲۱-۲٪ و چربی کل ۸-۱۳٪ متغیر بود. میزان SFA بین ۲۱-۴۸٪ و MUFA بین ۳۳-۵۳٪ و PUFA بین ۱۱-۲۸/۵٪ در ایزوله های خالص شده متغیر بود. بیشترین میزان PUFA و ویتامین نیاسین (B3) متعلق به گونه کلرلا و لگاریس است. بالاترین میزان پروتئین ۴۰/۱۲ درصد وزن خشک در گونه *Dunaliella cf. bardawil* و بیشترین میزان کل اسیدهای

چرب (۳۰٪ در گرم وزن خشک) در ایزوله ۲ گونه اکرومونات اندازه گیری شد. استرین دوم گونه اکرومونات دارای بالاترین مقدار چربی کل می باشد. گونه کیتوسروس نسبت به بقیه گونه ها از رشد نسبی بالاتری برخوردار بود.

۱- مقدمه و مروری بر منابع

کشت و پرورش جلبک های میکروسکوپی و یا نانوپلانکتون هایکی از صنایع مهم و با ارزش در دنیا به شمار می رود. اصطلاح میکروجلبک ها یا میکروآلگا (Micro-Algae) اشاره به موجودات تک سلولی پرو و یوکاریوت دارد که متعلق به چندین رده می باشند. این رده ها عبارتند از: سیانوفیسه (Cyanophyceae)، کلروفیسه (Chlorophyceae)، یوگلنوفیسه (Euglenophyceae)، گزانتوفیسه (Xantophyceae)، باسیولاریفیسه (Bacillariophyceae)، و رودوفیسه (Rhodophyceae)، که دارای رنگدانه های مختلف فتوسنتزی می باشند. بیش از ۴۰۰۰۰ گونه تا به حال شناخته شده است و با توجه به تکنیک های جدید مولکولی هر روز به تعداد این گونه ها اضافه می شود. این ها به عنوان تولید کنندگان اولیه و به عنوان غذا برای مصرف کنندگانی مانند: روتیفر، کپه پودا، میگو و مراحل لاروی و جوانی بسیاری از ماهیان، سخت پوستان و دوکفه ای ها محسوب می شوند.

میکروآلگ ها همچنین به دلیل ارزش غذایی بسیار بالا در سلامت آبزیان اهمیت به سزایی دارند. ترکیبات شیمیایی موجود در ارگانسم ها در مقایسه با دیگر صنایع حیوانی و گیاهی بسیار قابل توجه می باشد. به عنوان مثال: میزان پروتئین، کربوهیدرات و لیپید در گوشت به ترتیب ۴۳٪، ۱٪ و ۳۴٪ می باشد و در لوبیا و سویا به ترتیب ۳۷٪، ۳۰٪ و ۲۰٪ می باشد؛ در حالی که در کلرولا و لگاریس به ترتیب ۵۸-۵۱، ۱۷-۲۱ و

۲۲-۱۴ درصد می باشد (Guil-Guerrero et al., 2004). با توجه به افزایش روزافزون جمعیت دنیا و نیاز به پروتئین بیشتر از اوایل سال های دهه ۱۹۵۰ توجه و تمرکز بر روی میکروآلگ ها به عنوان منبع پروتئین جلبک معطوف گردید (Pauline et al., 2006). سلول های میکروآلگ ها قادر به سنتز تمام اسیدهای آمینه ضروری مورد نیاز انسان و دیگر موجودات هستند (Guil-Guerrero et al., 2004).

کربوهیدرات ها در میکروآلگ ها به فرم های نشاسته، گلوکز، گالاکتوز و دیگر پلی ساکارید ها قابلیت هضم بسیار بالایی دارند. میزان متوسط لیپید در سلول جلبک های مختلف بین ۶۰٪-۱ می باشد و گاهی به میزان ۹۰٪ وزن خشک آنها می رسد. لیپید در مراحل اولیه رشد بسیاری از ماهیان دریایی و همچنین بر روی تخم ریزی و کیفیت تخم آنها، تأثیر مهمی دارد. کمبود ترکیبات n-3 تأثیر منفی بر روی درصد باروری تخم ها -لقاح و میزان هچ شدن آنها دارد (Brown 1997; Brown 2002).

انواع اسید های غیر اشباع (P_{UFA}) که به وسیله آلگ ها سنتز می شوند؛ برای رشد ماهیان، میگو و نرمتان لازم هستند و کمبود آنها سبب کاهش درصد بقا می شود. همین طور میزان HUFA (Highly unsaturated fatty acids) به خصوص EPA (20:3 n-5)، AA (20:6 n-6) و DHA (22:6 n-3) در ارزیابی ترکیبات غذایی نانوفیتوپلانکتون ها به عنوان ترکیبات ضروری برای آبزیان بسیار مهم هستند. بسیاری از آبزیان که در آبرزی پروری اهمیت دارند مانند ماهیان، میگو و نرمتان دارای توانایی کمی برای سنتز بعضی از اسید های چرب اشباع (H_{UFA}) با تعداد اتم های کربن ۲۲-۲۰ با باند دو گانه و سه گانه دارند (Soudant et al. 2000). لذا HUFA و کلسترول جزو ترکیبات ضروری هستند که می بایست توسط مواد مغذی برای این آبزیان فراهم گردد و این ترکیبات ضروری در اغلب میکروآلگ ها نسبت به بقیه ارگانسیم ها غالب هستند (Lin et al., 1982). لازم به ذکر است که میزان اسیدهای چرب تحت تأثیر فاکتور های محیطی و میزان نوتریت ها می باشد (Brown et

al., 1993). همچنین میکروآلگک ها به عنوان منبع غنی از تمام ویتامین های ضروری مانند: E، C، B12، B6، Bz، B، A و بیوتین، اسید فولیک و اسید پنتوتنیک می باشند (Brown et al., 1996). میزان ویتامین ها هم تحت تأثیر فاکتور های محیطی و روش های خشک کردن و برداشت آنها تغییر می یابد. با توجه به ارزش غذایی بالا، جلبک های میکروسکوپی به عنوان غذای زنده یکی از اجزای اصلی صنعت تکثیر و پرورش بسیاری از آبزیان مهم و تجاری محسوب می شوند. کشت صنعتی و در حد گارگاه های تکثیر و پرورش در طی چند دهه اخیر افزایش یافته است. کشت انبوه آن ها در دهه ۱۹۶۰ در ژاپن با کشت گونه *Chlorella* آغاز شد از دهه ۱۹۸۰ به بعد ۴۶ کارخانه به کشت انبوه این گونه اختصاص داشته است و در هر ماه بیش از ۱۰۰۰ کیلوگرم میکروالگک تولید می شود که مصارف تجاری زیادی را دربرداشته است (Muller 2000). کشت انبوه سیانوباکتری هایی مانند هماتوکوکوس *Haematococcus plavialis*، به عنوان منبع آستاگزانتین و دیگر میکروآلگک ها در هند و آمریکا و استرالیا آغاز شد. صنعت بیوتکنولوژی میکروآلگک ها در طول مدت کمتر از ۳۰ سال پیشرفت قابل توجهی نشان داد (Muller 2000; Muller et al., 2003a).

امروزه تولیدات میکروآلگک ها به ۵۰۰ تن وزن خشک در سال می رسد که تقریباً در حدود $10^9 \times 1/25$ در سال ارزش اقتصادی دارد (Muller et al. 2003b).

در سال ۱۹۹۹ تولیدات میکروآلگک های مورد استفاده در تکثیر و پرورش به ۱۰۰۰ تن رسید. از این مقدار ۶۲٪ مورد استفاده نرمتان، ۲۱ درصد برای میگو و ۱۶٪ برای ماهیان مورد استفاده قرار گرفت. در دهه های اخیر علاوه بر اهمیت میکروآلگک ها به عنوان غذای زنده در آبی پروری، به فرم های مختلف مانند کپسول، قرص، شربت و همچنین به صورت افزودنی در انواع اسنک های غذایی، شکلات و آدامس ها مورد استفاده انسان قرار گرفته است (Broun et al., 2002). گونه های رایج برای مصارف انسانی عبارتند از:

Arthrospira، Chlorella، Dunaliella و Aphanizemon. در چین و هند محصولات حاصل از گونه اولی به دلیل پروتئین بالا بسیار مورد استفاده قرار می گیرد. بیش از ۷۰ کمپانی در تایوان Chlorella تولید می کنند (Renaud et al., 2002). مهمترین ماده ای که توسط این گونه تولید می شود بتاگلوکان ها است که سیستم ایمنی را فعال کرده و سبب کاهش چربی خون می شوند و خواص بسیار با ارزش دیگری از جمله مکمل غذایی، منبع بتاکاروتن، ضدسرطان و ... برای گونه های این جنس معرفی شده است (Richmond 2005).

امروزه در اکثر مناطق دنیا گونه های محدودی هستند که در تکثیر و پرورش به کار می روند. اولین عامل مهمی که در انتخاب یک گونه مناسب به عنوان غذای زنده دخیل می باشد، انتخاب گونه هایی است که به صورت طبیعی در محیط زندگی آبی، چه دریاچه و چه رودخانه، وجود دارد و کشت آنها آسان می باشد (Hiramatsu et al. 2000). این گونه های پلانکتونی اصولاً نانوپلانکتون ها هستند که به صورت آزاد وجود دارند و اندازه شان بین ۲۰-۲ میکرومتر می باشد. از خصوصیات دیگری که یک گونه را برای تکثیر و پرورش مناسب می سازد، میزان رشد آن است که باید سریع باشد. عوامل دیگری مانند: میزان درجه حرارت، شوری، mixing و pH هم بر روی رشد و کشت میکروآلگ ها تأثیر دارند (Brown 1997).

تقسیم سلولی گونه های فتواتوتروف تحت تأثیر شدت نور و مدت زمان در معرض نور قرار گرفتن آنها می باشد. میزان شدت نور مورد نیاز برای اکثر گونه ها بین ۶۰۰ - ۳۰۰ ME/ms می باشد ولی درمیزان رشد بعضی از گونه ها مانند: *Chaetoceros gracilis* و *Isochrysis affinis* در شدت نورهای ۱۶۵ ME/ms و ۳۰۰ تفاوت قابل توجهی مشاهده نگردید (Ryu & Tokada 1984). گونه هایی مانند *Nanochloropsis sp.* میزان رشد خوبی را در شدت نور ۷۵ ME/ms نشان می دهند (Brown 1998). از آنجایی در محیط طبیعی، هر گونه در یک شبانه روز به صورت دوره ای در معرض نور و تاریکی قرار می گیرد، در شرایط آزمایشگاهی هم اکثر

گونه ها در تاریکی /روشنایی ۱۲:۱۲ رشد مناسبی دارند. بعضی از گونه های مناطق ساب تروپیکال هم که در معرض دوره نوری روشنایی/تاریکی ۱۴:۱۰ قرار می گیرند؛ می توانند رشد خوبی را نشان دهند.

لازم به ذکر است هر لامپ مهتابی فلورسنت سفید کوچک تقریباً معادل ۱ ME/ms و یا تقریباً ۷۴ لوکس می باشد (Thimijan & Royal 1982) و هر لامپ مهتابی ۲۵۰ واتی معادل ۵۰۵ lux می باشد.

محیط کشت F2 و Conway محیط های کشت بسیار رایج و مناسبی برای کشت اغلب میکروآلگ های هستند که در تکثیر و پرورش استفاده می شوند. در عین حال ترکیبات محیط کشت بر روی ترکیبات بیوشیمیایی سلول های پلانکتونی، به خصوص میزان اسیدهای چرب و پروتئین آنها تأثیر دارد (Sanchez et al., 1999). اضافه کردن مواد آلی به عنوان منبع انرژی به بعضی از گونه های میکروآلگ، توانایی رشد در تاریکی را در آن ها ایجاد می نماید. مواد آلی مانند گلوکز، اسید آمینه، اسید کربونیک و اسید نیتریک در غلظت های مختلف می توانند جایگزین منبع نوری برای گونه هایی مانند *Cheatoceros gracils* شود. گونه هایی مانند *Nitzschia* و *Ochromonas* که اخیراً در صنعت تکثیر و پرورش آبزیان مورد توجه قرار گرفته اند، از جمله گونه هایی محسوب می شوند که توانایی رشد سریع در شرایط هتروتروفی را دارند (Richmond, 2005).

درجه حرارت اپتیمم برای رشد اغلب گونه های میکرو جلبک $1^{\circ}\text{C} \pm 25^{\circ}\text{C}$ می باشد اما برای بعضی از گونه ها مانند *Tetraselmis* درجه حرارت 20°C و برای گونه *Arthrospira* بین $35-38^{\circ}\text{C}$ می باشد (Blanchemain, 1999; Lopez-munoz et al., 1992). بیشتر گونه های میکروآلگ یوری هالین بوده و بعضی از گونه ها مانند *Dunaliella* در عین حال که قادر به رشد در شوری های بسیار بالا می باشند، مکانیسم سازش به شوری های کمتر را هم دارند؛ ولی شوری ترجیحی اغلب گونه ها کمتر از شوری آب دریا می

باشد و در شوری ۲۵ psu رشد مناسبی را نشان می دهند. علی رغم تنوع گونه ای بسیار بالای نانو فیتوپلانکتون ها، هنوز تعداد گونه هایی که در صنعت آبزی پروری در دنیا استفاده می شود بسیار محدود است ولی تحقیقات چند سال اخیر به سمتی پیش می رود که تعداد گونه های میکرو جلبکی مطرح به عنوان غذای زنده افزایش یابد. گونه های بوی هر منطقه جغرافیایی بهتر پاسخ گوی نیازهای گونه های آبزیان همان منطقه است.

Knuckey و همکاران در سال ۱۹۹۸، ده استرین از دیاتومه های نانو پلانکتون از آب های استرالیا را جدا کرده و مورد ارزیابی غذایی برای تغذیه اویسترهای جوان قرار گرفت. Rao و همکاران در سال ۲۰۰۵ گونه های کلامیدوموناس و *Nitzschia frustula* را از آب های خلیج کویت جدا کرده و پتانسیل غذایی آن ها را به عنوان غذای زنده برای آبزی پروری مناطق تروپیکال مورد ارزیابی قرار دادند.

Brown و همکاران (۱۹۹۷) ۴۰ گونه میکرو جلبک را که برای پرورش گونه های دریایی مناطق معتدل، مناسب بودند را مورد ارزیابی غذایی قرار دادند و آن ها را به عنوان گونه هایی معرفی کردند که برای آبزیان استرالیایی مورد استفاده قرار می گیرند و سازش مناسبی را برای گونه های تروپیکال نشان می دهند.

در ایران تاکنون تحقیقات اندکی در خصوص جداسازی گونه های بومی دریایی صورت گرفته است و اغلب گونه هایی که در تکثیر و پرورش آبزیان استفاده می شود، گونه های میکرو جلبک وارداتی هستند.

تنها گونه *Skeletonema* از آب های بوشهر جدا شده است (عربی نژاد ۱۳۷۴) و هیچ گونه گزارش قابل استناد دیگری مبنی بر جدا سازی و خالص سازی گونه های بومی دریای عمان وجود ندارد. با توجه به اینکه میزان شوری، مواد مغذی و نور به طور قابل ملاحظه ای در سائز و شکل بسیاری از میکروآلگک ها تغییر ایجاد می کند؛ لذا شناسایی این گونه ها که سائز زیر ۲۰ میکرومتر دارند با استفاده از میکروسکوپ نوری بسیار دشوار

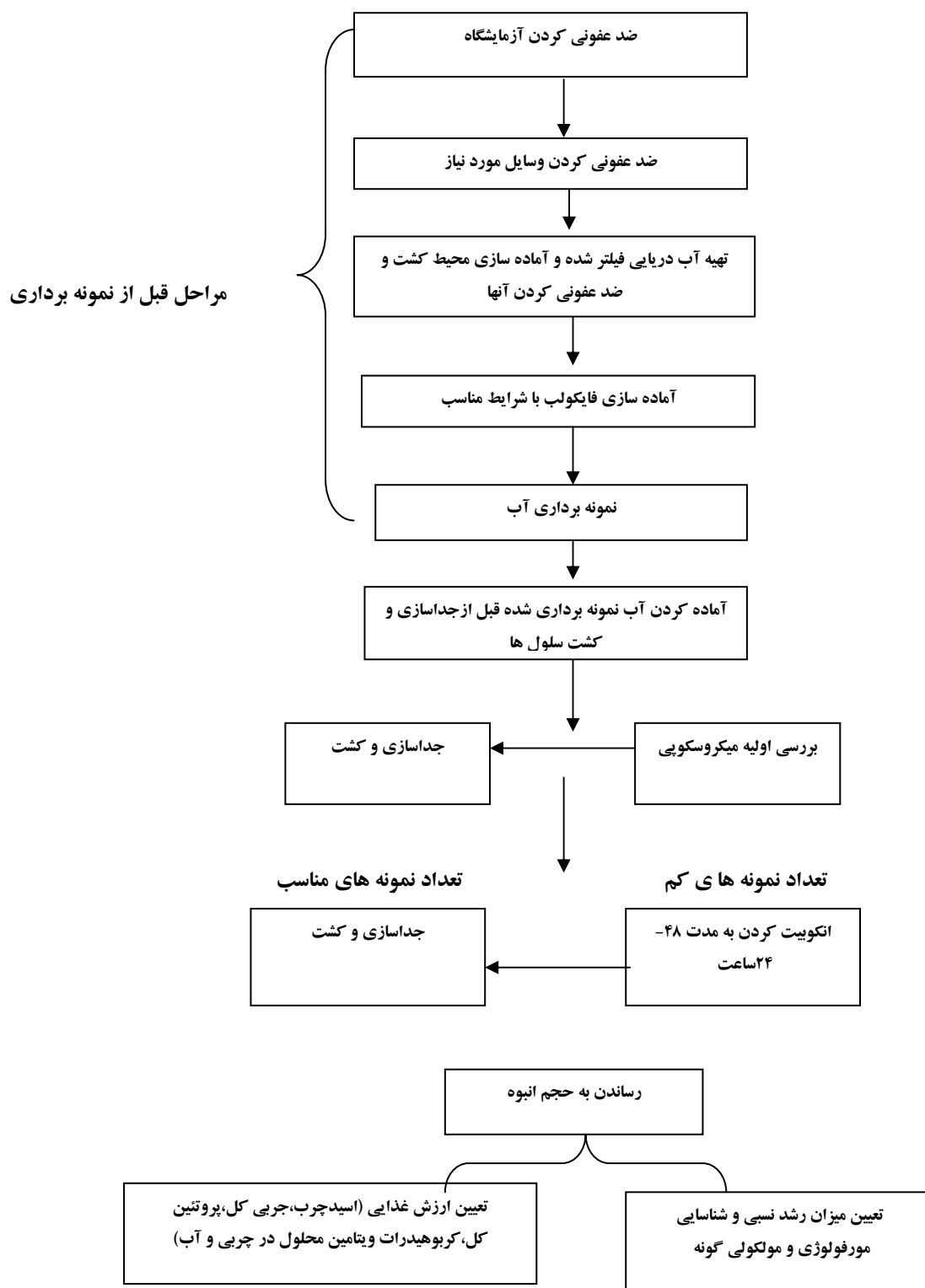
و در بیشتر مواقع قابل اطمینان نمی باشد و طبقه بندی گونه ها دچار اشکال می شود. به عنوان مثال گونه *Chlorella* با گونه *nanochloropsis* یا گونه *Nitzschia closterium* با گونه *Phaeodactylum* به اشتباه شناسایی می شوند (Guglielmi, 1993). امروزه تکنیک های شناسایی مولکول همراه با شناسایی مورفولوژی برای سلول های سائیز ریز تا حدودی به شناسایی دقیق گونه ها کمک کرده است.

در تحقیق حاضر با هدف استفاده از گونه های بومی با ارزش در آبرزی پروری، گونه های میکروآلگ ها از سواحل دریای عمان جداسازی و خالص سازی گردیدند. سپس شناسایی گونه ها با کمک تکنیک های مولکولی همراه با مورفولوژی گونه ها به انجام رسید. همچنین به منظور معرفی گونه های بومی مناسب آبرزی پروری پتانسیل غذایی آنها از جمله میزان کربوهیدرات، پروتئین، لیپید، اسیدهای چرب و ویتامین های موجود در گونه خالص سازی شده مورد بررسی قرار گرفتند.

۲- مواد و روش ها

مراحل انجام کار در پروژه حاضر جهت جداسازی، خالص سازی، شناسایی، آنالیز های مولکولی و تعیین ارزش غذایی فیتوپلانکتون های بومی دریای عمان به ترتیب اولویت در فلوچارت ۱ مشخص گردیده است. سپس به تفکیک هر مرحله توضیح داده شده است.

فلو چارت ۱: مراحل انجام کار در این پروژه



۲-۱- مراحل قبل از نمونه برداری

۲-۱-۱- ضد عفونی کردن آزمایشگاه

محیط آزمایشگاهی که در آن پروسه جداسازی و خالص سازی انجام می شود باید کاملاً تمیز و استریل باشد و برای این منظور آزمایشگاه پلانکتون مرکز تحقیقات شیلات چابهار کاملاً تمیز گردید و به جهت جلوگیری از ورود گرد و غبار به محیط آزمایشگاه، درز پنجره ها گرفته شد و تمام سکو ها با الکل ۷۰٪ اسپری و تمیز گردید. هودی که در آزمایشگاه قرار داشت، مجهز به لامپ UV گردید و در تمام طول شب به منظور ضد عفونی کردن سکو و وسایل کار زیر هود روشن نگه داشته شد. کلیه مراحل کشت در زیر این هود انجام گردید.

اگر نمونه ای که جدا می شود قبل از خالص شدن آلوده به میکروب و ویروس یا قارچ گردد، بهتر است از آن نمونه صرف نظر گردد در غیر این صورت وقت بسیار زیادی باید صرف از بین بردن آلودگی های آن نمونه کرد. به همین دلیل در این پروژه سعی گردید مراحل جدا سازی و خالص سازی در محیطی تمیز و استریل انجام شود.

۲-۱-۲- ضد عفونی کردن وسایل

وسایل مورد استفاده از جمله بطری ها، پی پت پاستور، لوله های آزمایش و ظروف شیشه ای مورد استفاده اگر هم برای اولین بار استفاده می شدند، ابتدا با آب مقطر شسته شده سپس در درجه حرارت 121°C به مدت ۱۵ دقیقه اتوکلاو گردیدند. بعد از اتوکلاو در آون با درجه حرارت 100°C به مدت ۲ ساعت قرارداده

شدند تا خشک شوند. سپس در جعبه های پلاستیکی درب دار تمیز گذاشته شده و در یک کابینت مخصوص قرار گرفتند. ظروف بعد از یک بار استفاده طبق مراحل زیر شستشو داده شدند:

ابتدا ظروف به مدت یک ساعت در هیپوکلریت سدیم با کلر ۵٪ غوطه ور شده، سپس آب کشی گردیدند و بعد از آن به مدت ۵ ساعت در محلول کلر ۱/۵-۱٪ قرار گرفته، بعد از آبکشی و قرار گرفتن در آب معمولی، به منظور کلر زدایی به مدت ۵ ساعت در محلول تیوسولفات سدیم ۵٪ درصد قرارداده شدند. سپس ظروف را با آب مقطر آب کشی نموده، به اتوکلاو منتقل شدند و در مرحله آخر تحت حرارت آون به شرح بالا خشک گردیدند.

۲-۱-۳- آب دریای فیلتر شده و آماده سازی محیط کشت

به منظور آماده سازی محیط کشت، ابتدا آب دریا را از فیلتر های مخصوص عبور داده و بعد از چندین بار فیلتر کردن آنرا در چندین بطری یک لیتری قابل اتوکلاو قرارداده و بعد از اتوکلاو، برای ساختن انواع محیط های کشت استفاده گردید. در ابتدای پروژه از دو نوع محیط کشت رایج F2 و F2s استفاده گردید. هر دو نوع محیط کشت طبق جدول الف ساخته شدند. محیط های کشت دیگر هم ساخته شده و تا قبل از استفاده در یخچال نگه داری شدند.

محیط کشت F2 یک محیط کشت همگانی است و اغلب فیتوپلانکتون ها در آن رشد می کنند. محیط کشت F2s مانند F2 است فقط ترکیبات سلیس دارد که برای دیاتومه که پوسته سیلیسی دارند مناسب می باشد (جدول الف) محیط کشت مطابق جدول زیر ساخته شد.

جدول الف: محیط کشت F2 (Gillard and Ryther, 1962)

Stocks	per litre
(1) Trace elements (chelated)	
Na ₂ EDTA	4.16 g
FeCl ₃ .6H ₂ O	3.15 g
CuSO ₄ .5H ₂ O	0.01 g
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0.022 g
CoCl ₂ .6H ₂ O	0.01 g
MnCl ₂ .4H ₂ O	0.18 g
Na ₂ MuO ₄ .2H ₂ O	0.006 g
(2) Vitamin mix	
Cyanocobalamin (Vitamin B ₁₂)	0.0005 g
Thiamine HCl (Vitamin B ₁)	0.1 g
Biotin	0.0005 g
 Medium	 per litre
NaNO ₃	0.075 g
NaH ₂ PO ₄ .2H ₂ O	0.00565 g
Trace elements stock solution (1)	1. 0 ml
Vitamin mix stock solution (2)	1. 0 ml

ابتدا مطابق جدول بالا محلول های ۱ و ۲ را ساخته سپس مواد اشاره شده در قسمت پایین جدول را

در یک لیتر آب دریای فیلتر شده و اتوکلاو گردیده، اضافه می کنیم.

به منظور آماده سازی فایکولب ابتدا طبقه های شیشه ای نصب و در بالای هر طبقه ۲ لامپ مهتابی

سفید ۲۵۰ واتی نصب گردید. محیط فایکولب استریل شد و سعی گردید در تمام طول پروژه

استریل بماند و از ورود افراد متفرقه جلوگیری شد. شکل های زیر وضعیت کشت فیتوپلانکتونها را

در فایکولب نشان می دهد.



شکل الف: فایکولب مرکز تحقیقات شیلات چابهار، کشت و خالص سازی فیتوپلانکتون ها
در پروژه حاضر



شکل ب: فایکولب مرکز تحقیقات شیلات چابهار، چهار ایزوله از گونه های خالص شده

دوره زمانی در فایکولب با برنامه تایمر برای روشن و خاموش شدن اتوماتیک لامپ ها با نسبت ۱۲:۱۲ روشنایی- تاریکی ، درجه حرارت اتاق متناسب با درجه حرارت محیط طبیعی نمونه بر روی $1 \pm 24^{\circ}\text{C}$ و شدت نور مناسب برای هر نمونه تقریباً بین $170 - 150 \text{ ME/m}^2\text{s}$ تنظیم گردید. نمونه هایی که احتیاج به نور کمتری داشتند، دورتر از منبع نور قرار گرفتند. علاوه بر نگه داشتن نمونه ها با شرایط ذکر شده، بعضی از نمونه ها در ژرمیناتور دانشگاه دریانوردی چابهار با تنظیم سیکل نوری ۱۰:۱۴ روشنایی - تاریکی، درجه حرارت متفاوت و شرایط کاملاً استریل نگه داشته شدند.

۲-۲- نمونه برداری آب

بعد از اینکه کلیه موارد ذکر شده در بالا قبل از انجام هر کشت آماده گردید، نمونه برداری از آب انجام شد. در مطالعه حاضر نمونه برداری آب از اوایل مهرماه ۱۳۸۷ به مدت ۱/۵ سال از نواحی ساحلی مناطق چابهار، رمین، دریابزرگ، تیس، گواتر، بریس و لیپار انجام شد. نمونه برداری ابتدا به صورت هفتگی و گاهی هر روز یکبار و بستگی به حجم نمونه از یک یا دو منطقه انجام شد. به منظور کاهش هزینه ها سعی گردید انجام گشت های دریایی این پروژه هم زمان با گشت های دیگر پروژه های مرکز تحقیقات شیلات چابهار انجام پذیرد.

نمونه ها با استفاده از بطری روتنر از عمق ۳ متری و در صورت نمونه برداری با قایق از سطح ۷۰-۳۰ سانتی متری با استفاده از دبه های پلاستیکی جمع آوری شدند. سپس در اسرع وقت به آزمایشگاه انتقال یافتند. از هر منطقه حداقل از ۳-۴ ایستگاه مختلف نمونه برداری انجام شد.

نمونه ها بعد از انتقال به آزمایشگاه بلافاصله از تورپلانکتون با مش ۵۵ میکرون عبور داده شدند تا ازخورده شدن فیتوها توسط زئوپلانکتون ها جلوگیری شود. سپس آب نمونه ها با استفاده از فیلتراسیون کاهش یافت.

۲-۳- جداسازی و خالص سازی میکروجلبک ها

به منظور جداسازی سلول های نانوفیتوپلانکتون ابتدا نمونه ها زیرمیکروسوپ بررسی اولیه و در صورت تراکم مناسب انواع گونه ها جداسازی و کشت داده شدند. اگر تراکم سلول های پلانکتونی پایین بود در حدود ۲۰ میلی لیتر از آن را به ارلن انتقال داده و در فایکولب تحت شرایط مناسب نگهداری می شدند. به این طریق گونه ها شانس بیشتری برای افزایش تراکم پیدا می کردند و جدا سازی آنها راحت تر صورت می گرفت. در این پروژه برای جداسازی سلول های نانوپلانکتون چندین روش مورد ارزیابی قرار گرفت کلیه روش ها براساس روش های ارایه شده در Attaran-Fariman, 2007 و Csiro, 2008 می باشد.

روش هایی که برای جدا سازی سلول های نانوپلانکتون در پروژه مورد استفاده قرار گرفتند عبارتند از:

۱- رقیق سازی

۲- کشت روی آگار

۳- سانتریفوژ

۴- نور گرایی

۵- جداسازی تک سلولی ها

۲-۳-۱- روش رقیق سازی: در این روش ۱۰ لوله آزمایش درب دار استریل را برداشته و به هر کدام ۹ میلی لیتر محیط کشت F2 و به ۱۰ لوله آزمایش دیگر محیط کشت F2s اضافه کرده سپس ۱ cc از این لوله ها را

برداشته و به لوله دوم منتقل کردیم. به این ترتیب طبق شکل ۱ تا لوله آخر کار انتقال انجام پذیرفت. سپس بر روی تمام لوله ها نام محیط کشت استفاده شده، تاریخ و ترتیب لوله ها را ۱/۱۰ یا ۲/۱۰ ذکر کردیم. بعد از مدت یک هفته تک به تک لوله های آزمایش جهت رشد نمونه ها بررسی گردید و عملیات رقیق سازی تا رسیدن به ۱۰۰٪ خلوص و تک گونه ای شدن ادامه یافت.

۲-۳-۲- روش کشت روی آگار: این روش زمانی مورد استفاده قرار می گرفت که گونه های سبز با اندازه ریز در نمونه اولیه مورد بررسی وجود داشت. محیط کشت جامد با استفاده از پودر آگار Agar Baeta Agar با غلظت ۱-۲٪ ساخته شد سپس ۱-۲ قطره از نمونه مخلوط فیتوپلانکتون بر روی پلیت آگار قرار داده شد و به روش زیگزاکی کشت داده شدند. لازم به ذکر است عملیات انتقال در زیر هود انجام پذیرفت و کلیه لوله های آزمایش و لوپ سیمی مورد استفاده، توسط گاز تک شعله مستقر در زیر هود استریل گردیدند. سپس نمونه ها در فایکولب به مدت ۲-۳ هفته انکوبیت گردید و مرتب مورد بررسی قرار گرفتند. در صورت رشد نمونه ها در هر پلیت، فیتوپلانکتون آنها به محیط کشت مایع انتقال یافتند.

۲-۳-۳- روش سانتریفوژ: در این روش ۱۰ cc از نمونه ها را با دور کم ۲۰۰۰ به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ می کنیم. نمونه های سنگین تر در ته لوله پلی اتیلن جمع شده و نمونه های ریز تر مانده در سطح، جدا شده و طبق روش مناسب خالص سازی می گردد.

۲-۳-۴- روش نور گرایی: در این روش نمونه های آب حاوی پلانکتون را در بطری های ۵۰۰ سی سی ریخته و در مقابل منبع نوری قرار می دهیم؛ یا اینکه تمام قسمت ها را با فویل آلومینیم پوشانده و قسمتی را باز می گذاریم و نمونه هایی را که در قسمت منبع نور جمع می شوند با پی پت پاستور استریل برداشته و به لوله آزمایش حاوی محیط کشت منتقل می نماییم.

۲-۳-۵- روش جدا سازی تک سلولی ها: در این روش تک سلولی ها، با کمک پاستور پی پت کاملاً استریل برداشته شدند و به پلیت حاوی ۳۰ سی سی محیط کشت انتقال یافته سپس تحت شرایط مناسب در فایکولب انکوبیت شدند و بعد از ۴ روز پلیت ها مورد بررسی قرار گرفتند.

۲-۴- کشت در انواع محیط های کشت

محیط های کشت مختلفی که در این پروژه و طی پروسه خالص سازی استفاده گردید عبارتند از: F2s ، F2 ،

(Guillard and Ryther, 1962; Anderson 2005) SP ، Zarruks ، Bu

محیط کشت های مختلف به دو روش استفاده گردیدند. در ابتدا نمونه برداری آب حاوی پلانکتون در محیط های مختلف کشت داده شدند؛ به خصوص اگر تعداد دیاتومه ها زیاد بود در محیط F2s هم کشت داده شده تا پاسخ سلول به محیط کشت مورد ارزیابی قرار بگیرد. در حالت دوم زمانی گونه های خاصی مانند اسپیرولینا مشاهده گردید در محیط اختصاصی خاص گونه کشت داده شدند.

۲-۵- شناسایی استرین های خالص

شناسایی استرین های خالص شده به دو صورت انجام پذیرفت:

۱. مورفولوژی

۲. شناسایی مولکولی و توالی ژنی

۱. مورفولوژی: شناسایی گونه های خالص شده با استفاده از میکروسکوپ نوری فاز کنتراست و همین طور میکروسکوپ اینورت نیکون مجهز به دوربین مدل نیکون TF100 انجام شد. ولی نمونه های خالص شده از

نانوپلاتکتون ها بودند. سایز زیر ۲۰ میکرون داشته و اغلب نمونه های سایز آنها بین ۵-۱۰ میکرومتر بود. لذا شناسایی این گونه ها با استفاده از میکروسکوپ نوری نمی تواند خیلی قابل اطمینان باشد و تقریباً در بسیاری از موارد غیر ممکن است.

میکروسکوپ الکترونی SEM برای عکس برداری نمونه ها در نظر گرفته شده بود ولی به دلیل میسر نبودن امکانات و هزینه بالای آن در این پروژه استفاده نگردید.

۲- شناسایی مولکولی و بررسی توالی ژنی استرین های خالص

الف) استخراج DNA

DNA ریبوزی هر استرین خالص شده براساس روشهای CTAB ، DTAB ، Iysis Buffer و فنل - کلروفرم استخراج گردید. کلیه روش های استخراج بر مبنای روش های ارایه شده در منابع مختلف بود. لازم به ذکر است که به منظور استخراج DNA از هر استرین ابتدا یک روش بکار گرفته می شد اگر DNA با کیفیت مطلوب استخراج نمی شد سپس روش های دیگر مورد ارزیابی قرار می گرفتند.

ب) الکتروفورز

بعد از استخراج DNA به منظور بررسی کیفیت و کمیت DNA استخراج شده الکتروفون گردید . به منظور الکتروفورز از بافر TBE و ژل آگار ۱/۵٪ استفاده گردید. به منظور رنگ آمیزی ژل و نشان دار کردن و قابل رؤیت کردن DNA از اتیدیوم برومید استفاده گردید.

اتیدیوم برومید در حین آماده سازی ژل به صورت ۲ قطره قبل از سرد شدن ژل اضافه گردید (Attaran ۲۰۰۷)
(سپس نمونه DNA استخراج شده با Loading dye مخلوط گردیده و در چاهک های الکتروفورز قرار داده شدند سپس ژل مورد ارزیابی قرار گرفت.

اتدیوم برومید بسیار سمی و سرطان زا می باشد و لازم به ذکر است که ژل حاوی این ماده در هر مرحله ابتدا اتوکلاو شده و سپس در کیسه های زباله مخصوص در خارج از شهر به دور از دیگر زباله ها ریخته شدند و در تمام مراحل کار با این ماده از دستکش استفاده شد. بررسی کیفیت و کمیت باندهای DNA روی ژل الکتروفورز با استفاده از دستگاه ژل داکيومنت مدل BTS-20-MS Uritec انجام گرفت. این دستگاه مجهز به دوربین بوده و در هر مرحله از باند های تشکیل شده عکس برداری گردید. در صورتی که باندهای تشکیل شده در هر نمونه خالص بود و مقدار DNA آن مناسب بود آن نمونه انتخاب گردید و مراحل بعدی آن یعنی تکثیر DNA نمونه صورت می گرفت و اگر مقدار DNA در هر باند ضعیف بود و یا اینکه باندی تشکیل نمی شد سعی می شد با تغییر غلظت مواد یا با استفاده از روش استخراج دیگر، مجدداً استخراج DNA تکرار گردد.

ج) PCR

دومین D1 ، D2 و برای بعضی از نمونه ها دومین D-D6 از منطقه Large Subunit ژن با استفاده از جفت پرایمر های D2C-D1R و یاجفت پرایمر D1R-1428F براساس روش PCR ارائه شده. در ۲۰۰۷ Attaran fariman & Bolch انجام شد. سپس مجدداً محصول PCR براساس روش ارائه شده در قسمت قبل (ب) الکتروفورز گردیدند.

در صورت حضور نمونه ها و تشکیل باندهای مناسب در محصول PCR نمونه ها برای تعیین توالی با استفاده از کیت EXOSAP-IT Kit خالص گردیدند.

د) تعیین ردیف های ژنی (Sequencing)

بعد از خالص سازی محصول PCR به منظور تعیین توالی نوکلئوتید ها از کیت Big Dye Terminator Sequencing

Kit استفاده شد. سپس نمونه ها برای تعیین توالی توسط دستگاه Sequencer ارسال گردید.

برای مقایسه توالی نوکلئوتیدی استرین های ایرانی با گونه های موجود در بانک های اطلاعاتی ژنی از جمله

NCBI، DDBJ، EMBE مقایسه گردیدند.

به منظور یافتن نزدیکترین گونه به استرین ایرانی آنالیزهای مولکولی انجام و درخت فیلوژنی آنها رسم گردید.

نرم افزار های که در این آنالیز ها استفاده شد Tree view، Tree edit، phyip استفاده گردید.

به منظور بررسی فیلوژنی هر گونه از آنالیز های NJ، MP، ML استفاده گردید و توالی های گونه ها ی مشابه با

استرین ایرانی مورد بررسی و مقایسه قرار گرفت.

۲-۶- کشت حجم بالای گونه ها و تعیین نسبی رشد

استرین های خالص سازی شده توسط شیلنگ ها هوادهی به وسیله CO₂ هوادهی و پس از بررسی مورفولوژی

و مولکولی در دبه های ۲۰ لیتری به حجم بالا رسانده شدند برای حجم انبوه از محیط کشت Conway استفاده

گردید. بعضی از گونه ها علی رغم شناسایی مولکولی گونه و استفاده از محیط های مختلف به حجم بیشتر از

۱۰۰ سی سی نرسیدند و در حد نهایتاً ۱۰۰ سی سی باقی ماندند و به نظر می رسد برای رساندن به حجم بالا تر

به کار و زمان بیشتری نیاز داشته باشند. به منظور تعیین تراکم سلولها و رشد نسبی آنها طی یک ماه به ارلن های

500cc حاوی محیط کشت Conway در حدود 50cc از هراسترین را وارد کرده و در روزهای

۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰، ۲۵، ۳۰ تعداد سلول ها با ستفاده از لام نئوبار یا سدویک شمارش گردید و سپس نمودار رشد

نسبی آنها ترسیم گردید.

۲-۷- آنالیزهای ارزیابی غذایی

ارزش غذایی برای استرینهای خالص شده مورد ارزیابی قرار گرفت و از نظر چربی کل کربوهیدرات ، پروتئین کل ، پروفیل اسیدهای چرب و ویتامین های محلول در آب و چربی بررسی گردیدند. به منظور انجام آنالیزهای پتاسیل غذایی هر ایزوله ابتدا در دبه های ۲۰ لیتری به حجم انبوه رسانده شدند و بعد از ۱۰-۱۵ روز در مرحله تصاعدی رشد نمونه ها برداشت شده و تغلیظ گردیدند تا قبل از انجام آنالیز هادر فریزرنگه داشته شدند. پروفیل اسیدهای چرب با استفاده از دستگاه GC و ستون BPX70 تعیین گردید. اندازه گیری کمی کربو هیدرات با روش حجمی لین انیون بر اساس تیتراسیون با محلولهای فهلینگ تعیین گردید. پروتئین با روش ماکروکجلدال اندازه گیری شد. ویتامینهای محلول در آب با روش لیکوید کروماتوگرافی و استفاده از دستگاه HPLC تعیین گردید. ویتامینهای محلول در چربی با روش کروماتوگرافی مایع با استفاده از دستگاه HPLC با استفاده از ستون C18 تعیین گردید.

۳- نتایج

نتایج حاصل از این پروژه منجر به خالص سازی بیش از ۲۵ گونه که از آبهای مناطق مختلف ساحلی چابهار جدا شده بودند گردید. نمونه های خالص شد متعلق به رده های:

Dinophyceae Cyanophyceae, Bacillariophyceae, Chlorophyceae, Parsinophyceae, Prymnesiophyceae and هستند.

اگر چه خالص سازی داینو فیسه از اهداف پروژه نبوده ولی به منظور ایجاد بانک فیتوپلانکتونی خالص سازی گردیدند. پروسه خالص سازی بسیار مشکل و زمان بر است در عین حال گونه های زیادی در طول انجام پروژه جدا گردید و مدت زمان زیادی صرف خالص سازی هر گونه گردید تا اینکه هر گونه به صورت استرینهایی با صد درصد خلوص رسیدند. تقریباً ۱۵-۲۰ گونه در طی ۱ سال اول فاز عملیاتی پروژه خالص شد ولی متأسفانه به دلیل قطعی های مکرر برق در شهرستان چابهار و بروز شرایط نامتعادل آزمایشگاه و عدم امکانات آزمایشگاهی مانند (منبع تغذیه نوری) بسیاری از گونه های خالص شده که به حجم انبوه هم رسیده بودند از بین رفتند. لیست نمونه هایی که خالص سازی شده ولی از بین رفتند، نمونه هایی که در حال حاضر به حجم انبوه نرسیدند و همین طور آنهایی که به حجم انبوه رسیدند در جدول ۱ مشخص گردیده است.

شناسایی اولیه گونه ها که به استفاده از میکروسکوپ نوری مجهز به دوربین و فاز کانتراست انجام شده است به منظور توالی یابی ژنی و شناسایی مولکولی گونه ها استرینهایی که با بکار گیری روشهای مختلف استخراج (DNA) آنها موفقیت آمیز بوده پس از بررسی های به عمل آمده از نظر مورفولوژی و مطابقت با داده های مولکولی اسامی گونه های شناسایی شده مشخص گردید. بعضی گونه ها استخراج، PCR، DNA آن ها موفقیت آمیز بوده ولی پس از ارسال نمونه ها به منظور تعیین توالی ژنی جواب قانع کننده ای دریافت نشد که نتایج آن در قسمت توضیحات هر گونه آورده شده است.

جدول ۱: لیست نمونه های خالص سازی شده در طول اجرای پروژه حاضر

استرین های در حجم پایین (۱۰۰ میلی لیتر)	استرین های از بین رفته	استرین های با حجم انبوه	
*			<i>Cylandrotheaca sp.</i>
	*		<i>Oscillatoria sp.</i>
		*	<i>Chlorella sp.</i>
		*	<i>Isocrysis sp.</i>
*			<i>Nitzschia sp1.</i>
*			<i>Skeletonema sp.</i>
*			<i>Amphora sp.</i>
		*	<i>Dunaliella sp.</i>
	*		<i>Coscinodiscus sp.</i>
	*		<i>Spirulina sp.</i>
	*		<i>Tetraselmis sp.</i>
*			<i>Chaetoceros sp1.</i>
*			<i>Chaetoceros sp2.</i>
*			<i>Navicula sp.</i>
	*		<i>Noctiluca sp.</i>
	*		<i>Gymnodinium sp.</i>
	*		<i>Prorocentrum sp.</i>
*			<i>Heterocapsa sp.</i>
	*		<i>Cochlodinium sp.</i>
	*		<i>Gyrodinium sp.</i>

<i>Chattonella sp.</i>		*	
<i>unknown sp1.</i>	*		
<i>unknown sp 2.</i>	*		

در مورد نمونه هایی که حجم انبوه آن ها موفقیت آمیز بود، پتانسیل غذایی که شامل تعیین اسیدهای چرب، ویتامین های محلول در آب، میزان چربی کل، کربوهیدرات، پروتئین و همین طور تراکم سلول ها و رشد نسبی آنها مشخص گردیده است. به نمونه هایی که حجم انبوه آن ها موفقیت آمیز نبوده ولی ردیف ژنی شان تعیین گردیده هم در قسمت نتایج اشاره شده است.

۳-۱- نتایج حاصل از آنالیزهای مورفولوژی، مولکولی و پتانسیل غذایی به تفکیک گونه

بر اساس نتایج برخی از گونه های شناسایی مولکولی آنها موفقیت آمیز بوده و در حد جنس و یا گونه در این تحقیق معرفی گردیدند و اگر به حجم بالا رسیده باشند نتایج بررسی پتانسیل غذایی آنها در این قسمت از نتایج آورده شده است. و برخی گونه ها آنالیز مولکولی آنها موفقیت آمیز بود ولی به حجم بالا جهت بررسی پتانسیل غذایی نرسیدند که در مورد این گونه های فقط در حد ویژگیهای مورفولوژی و مولکولی گونه اشاره شده اند.

در زیر نتایج حاصل از شناسایی گونه و پتانسیل غذایی به تفکیک گونه اشاره شده است:

1- *Dunaliella cf. bardawil*

الف) آنالیزهای مورفولوژی و مولکولی گونه

یکی از گونه‌هایی که با موفقیت جدا سازی وخالص سازی و به حجم بالا رسید گونه دونالیا بارداویل بوده که پتانسیل غذایی و شناسایی مولکولی این گونه تعیین گردید. طبقه بندی گونه به شرح زیر می باشد :

Phylum *Chlorophyta* Pascher, 1914 -
Class *Chlorophyceae* Wille
Order *Volvocales* Oltmanns, 1904
Family *Dunaliellaceae* Christensen, 1967
Genus *Dunaliella* Teodoresco, 1904

دو استرین از جنس دونالیا جدا سازی و خالص گردید که به نام های زیر هر استرین نامگذاری گردید و با همین نام استرین در بانک ژن ثبت خواهد شد.

ایزوله ۱: CHPD1

توضیح مخفف هر حرف در زیرآمده است کلیه استرین ها مانند زیر نامگذاری گردیده اند (نامگذاری استرین ها سلیقه ای بوده ودر این تحقیق به شرح زیر انتخاب گردیده است)

(CH=Chabahar; P=Plankton; D= genus name; 1= Dunaleiela species 1)

ایزوله ۲: CHPD2

شماره ثبت در بانک ژنی

سایز گونه: ۱۰-۱۳ میکرومتر طول

رنگ گونه: قرمز-سبز

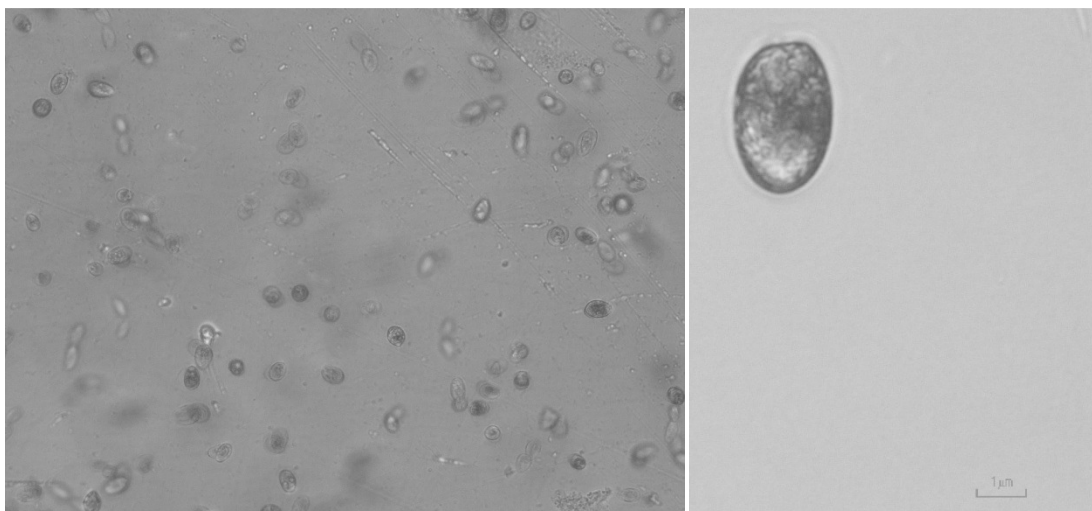
رنگ استرین: سبز رنگ

از این گونه، دو استرین که در زمان های مختلف از tide pool ها در زمان جذر از منطقه بریس نمونه برداری و خالص گردید گونه در زمان نمونه برداری کاملاً قرمز بوده و شوری آب در آن منطقه بیش از ۱۵۰ psu بود گونه در شرایط آزمایشگاهی به تدریج به شوری های پایین تر سازش داده شد و تا شوری ۷۵ هنوز گونه رنگ قرمز خود را حفظ کرده در شوری های کمتر از آن به رنگ سبز در آمده و در نهایت گونه به شوری ۲۵ psu سازش یافته و در محیط کشت f2 به خوبی رشد کرد. رنگ گونه قرمز-سبز و رنگ استرین آن سبز چمنی است.

گونه با روش رقیق سازی و کشت روی آگار خالص گردید و روشهای دیگر بکار برده شده برای خالص کردن این گونه موثر نبود.

از نظر مورفولوژی گونه شبیه گونه های *D. Salina*, *D. tertiolecta*, *D. bardawil* هم می باشد. به صورت تک سلولی با دو فلاژلا بیضی شکل و از بالا (Apical view) به صورت گرد است. به راحتی مورفولوژی با گونه های مشابه اشتباه گرفته خواهد شد. شکل های (۱) شکل کلی گونه را نشان می دهد.

نتایج شناسایی مولکولی استرین های ایرانی نشان داد که گونه از نظر توالی ژنی بیشتر به گونه *D. bardawil* شبیه است تا به گونه های *D. Salina*, *D. tertiolecta*. تمام گونه هایی که توالی ژنی آنها به استرین های ایرانی نزدیک هستند همراه با شماره ثبت آنها در بانک ژنی در جدول شماره ۲ آورده شده است.



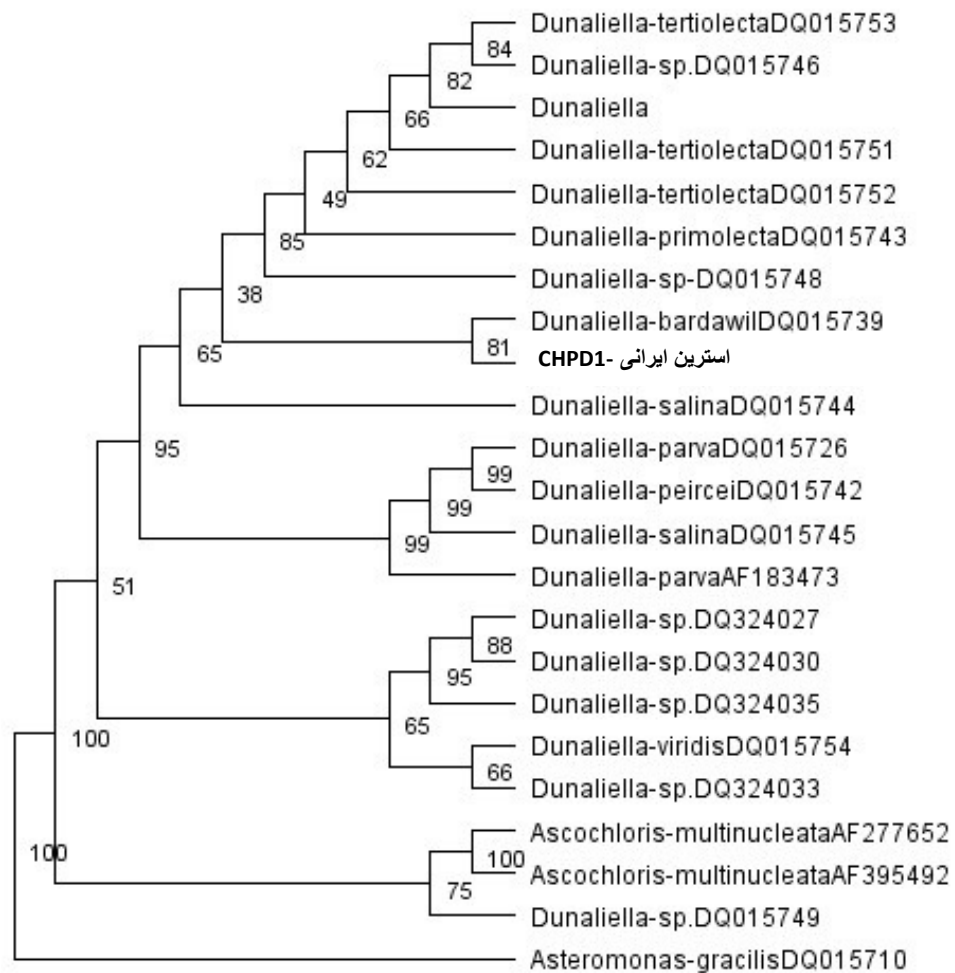
شکل ۱: گونه *D. bardawil* جدا شده و خالص شده از سواحل بریس. کشت خالص گونه (سمت چپ)، تک سلولی (سمت راست)

به دلیل شباهت زیاد مورفولوژی گونه ها، آنالیزهای مولکولی NJ, Mp, ML (bootstarp : 100) ابتدا برای هر استرین جداگانه انجام شد تا نزدیکترین توالی ژنی به هر استرین مشخص گردد. نتایج آنالیزها نشان داد که هر دو استرین (CHPD1, CHPD2) رابطه خویشاوندی نزدیکی به گونه *D. bardawil* دارند و گروه خوهری *D. salina* هستند (شکل) و مجدداً هر دو استرین با هم در یک آنالیزها به کار رفتند که نتیجه مشابه داد.

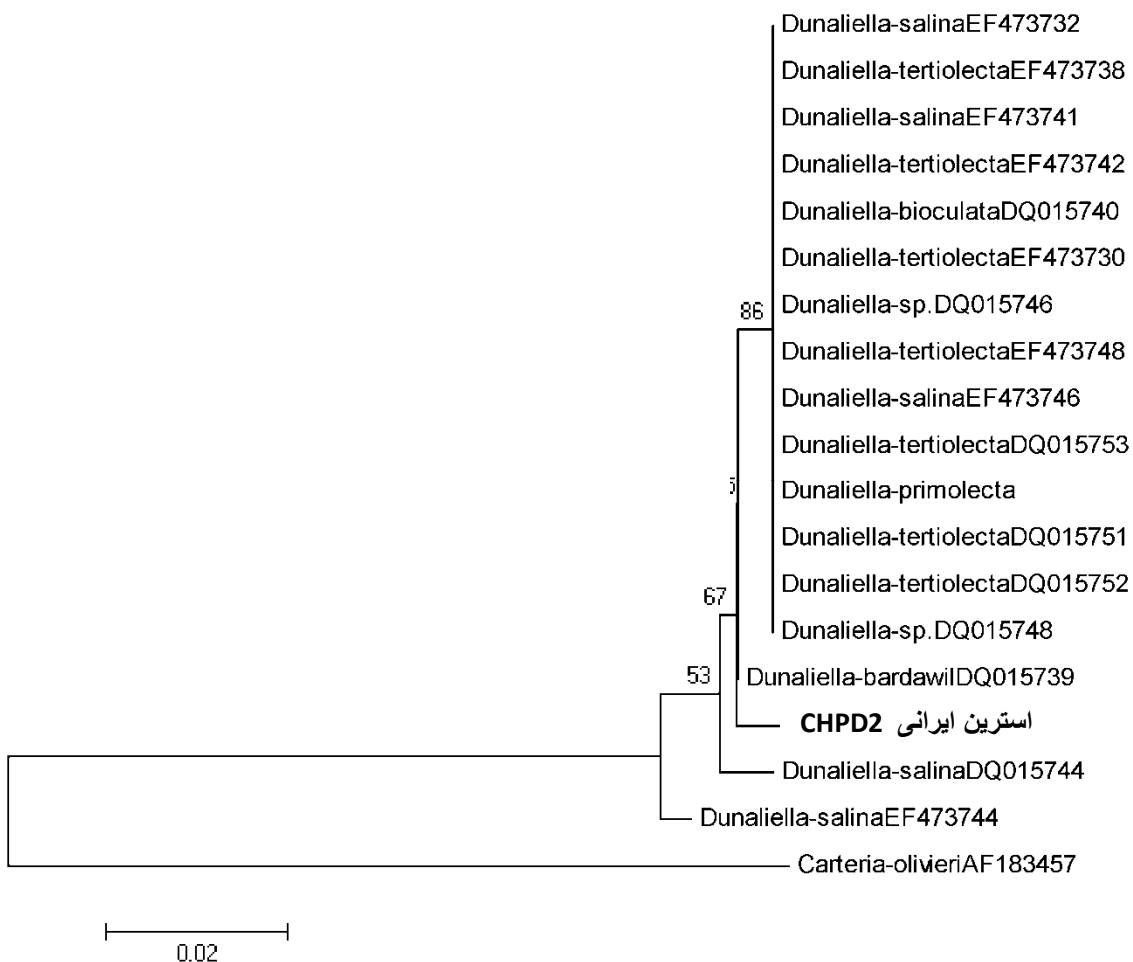
آنالیزهای مولکولی دو استرین ایرانی گونه دونالیا نیز موقعیت فیلوژنتیکی مشابهی را نشان داد. از آنجایی که آنالیزهای مولکولی NJ and ML هر دو نتایج یکسانی را نشان دادند، فقط یکی از درختهای فیلوژنی (ML) در این قسمت آورده شده است. (شکلهای ۲ و ۳) همانطور که در شکل مشخص است هر دو آنالیز شکلهای ۲ با درخت فیلوژنی شکل ۳ نتایج تقریباً مشابهی را با یک موقعیت فیلوژنتیکی برای استرینهای ایرانی نشان دادند.

جدول ۲: اسامی گونه های آنالیز مولکولی گونه (*Dunaliella cf. bardawil*) همراه با شماره های ثبت ژنی

نام گونه	GenBank No.
CHPD1	مطالعه حاضر
CHPD2	مطالعه حاضر
	DQ015739
<i>Dunaliella bardawil</i>	EF473748
<i>Dunaliella tertiolecta</i>	EF473746
<i>Dunaliella salina</i>	EF473742
<i>Dunaliella-tertiolecta</i>	EF473741
<i>Dunaliella salina</i>	EF473738
<i>Dunaliella tertiolecta</i>	EF473732
<i>Dunaliella salina</i>	EF473730
<i>Dunaliella tertiolecta</i>	DQ015753
<i>Dunaliella tertiolecta</i>	DQ015746
<i>Dunaliella sp.</i>	DQ015743
<i>Dunaliella primolecta</i>	DQ015740
<i>Dunaliella bioculata</i>	DQ015752
<i>Dunaliella tertiolecta</i>	DQ015751
<i>Dunaliella tertiolecta</i>	DQ015748
<i>Dunaliella sp</i>	DQ015744
<i>Dunaliella salina</i>	EF473744
<i>Dunaliella salina</i>	DQ015748
<i>Dunaliella sp.</i>	DQ015745
<i>Dunaliella parva</i>	DQ015742
<i>Dunaliella salina</i>	DQ015726
<i>Dunaliella parva</i>	AF183457
<i>Carteria olivier</i>	



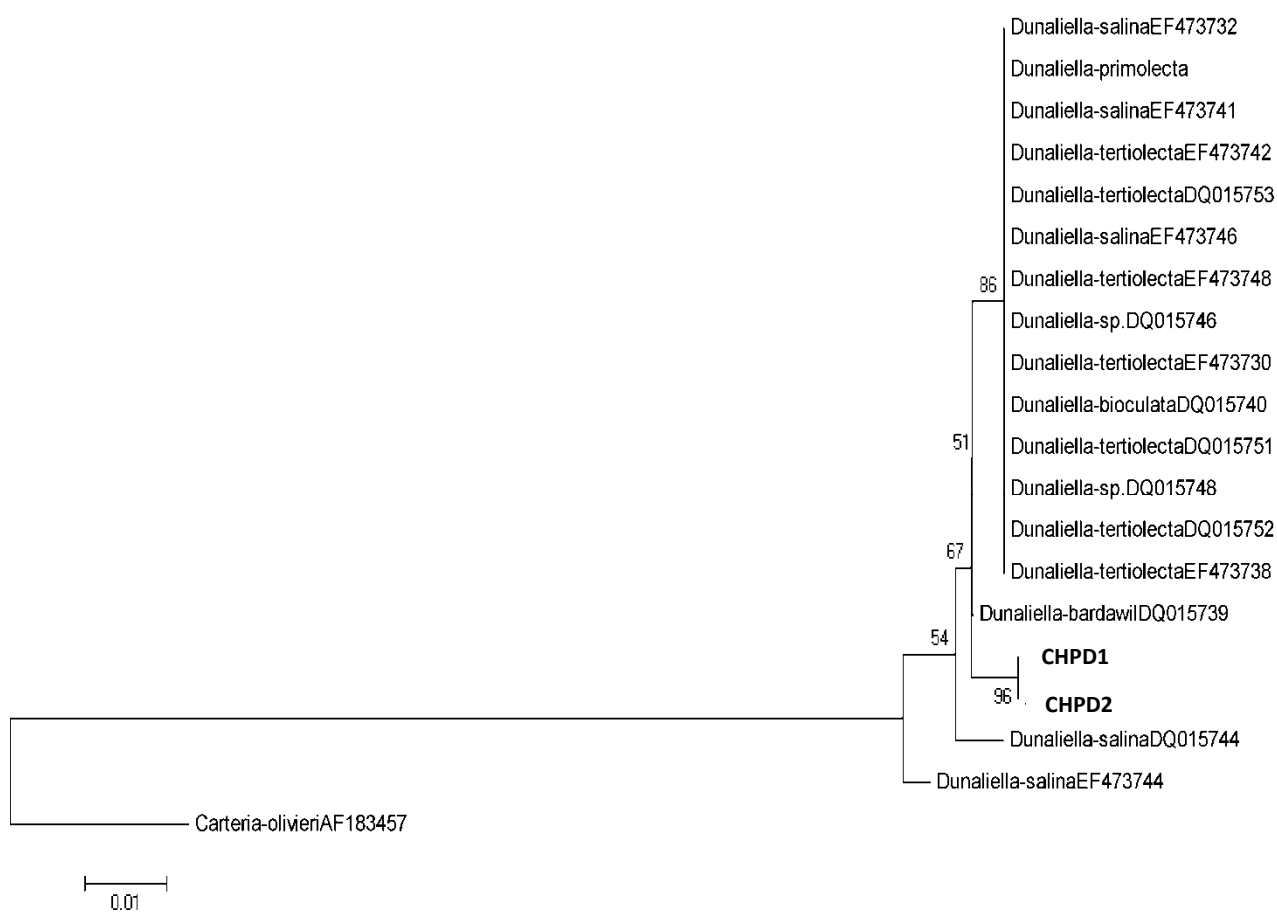
شکل ۲: درخت فیلوژنی استرین CHPD1 براساس توالی ژنی در قسمتی از ناحیه LSU با استفاده از آنالیز NJ مدل Tajima-Nei و الگوی بین نسل ها به صورت homogenous انتخاب گردید. اعداد bootstrap را بر اساس ۱۰۰ replication نشان می دهند. *Asteromonas Gracilis* به عنوان *outgroup* انتخاب گردید.



شکل ۳: درخت فیلوژنی استرین CHPD2 براساس توالی ژنی در قسمتی از ناحیه LSU با استفاده از آنالیز Maximum Likelihood (ML) و مدل و Jack contor الگوی ml Heuristics انتخاب گردید. اعداد bootstrap را بر

اساس ۱۰۰ replication نشان می دهند. *Carteria olivieri* به عنوان *outgroup*

انتخاب گردید.

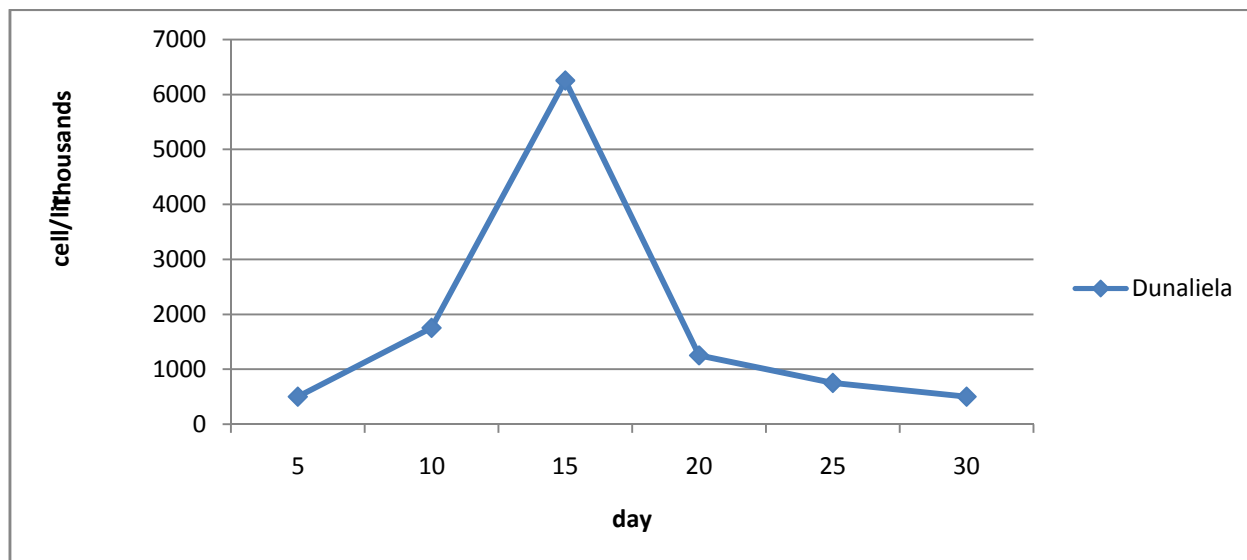


شکل ۴: درخت فیلوژنی دواسترین، CHPD2 و CHPD2 براساس توالی ژنی در قسمتی از ناحیه LSU با استفاده از آنالیز Maximum Likelihood (ML) و مدل و Jack contor الگوی ml Heuristics انتخاب گردید. اعداد bootstrap را بر اساس ۱۰۰ replication نشان می دهند. *Carteria olivieri* به عنوان *outgroup* انتخاب گردید.

از بررسی نتایج حاصل از موروفولوژی و مولکولی مشخص گردید استرین ایرانی گونه *Dunaliella bardawil* می باشد.

ب) رشد نسبی

بررسی نتایج محیطهای کشت مختلف نشان داد گونه در محیط F2 در حجم پایین و محیط کانوی در حجم بالا به خوبی رشد می کند نتایج حاصل از بررسی نسبی رشد نشان داد که گونه از روز ۵ تا روز ۱۰ در حدود سه برابر می شود و بعد از دو هفته به حداکثر رشد لگاریتمی خود رسیده است و بعد فاز ثابت رشد شروع شده است و بعد از آن وارد مرحله مرگ می شود (شکل ۵).



شکل ۵: تغییرات رشد نسبی *Dunaliella bardawil* استرین ایرانی طی ۳۰ روز بررسی

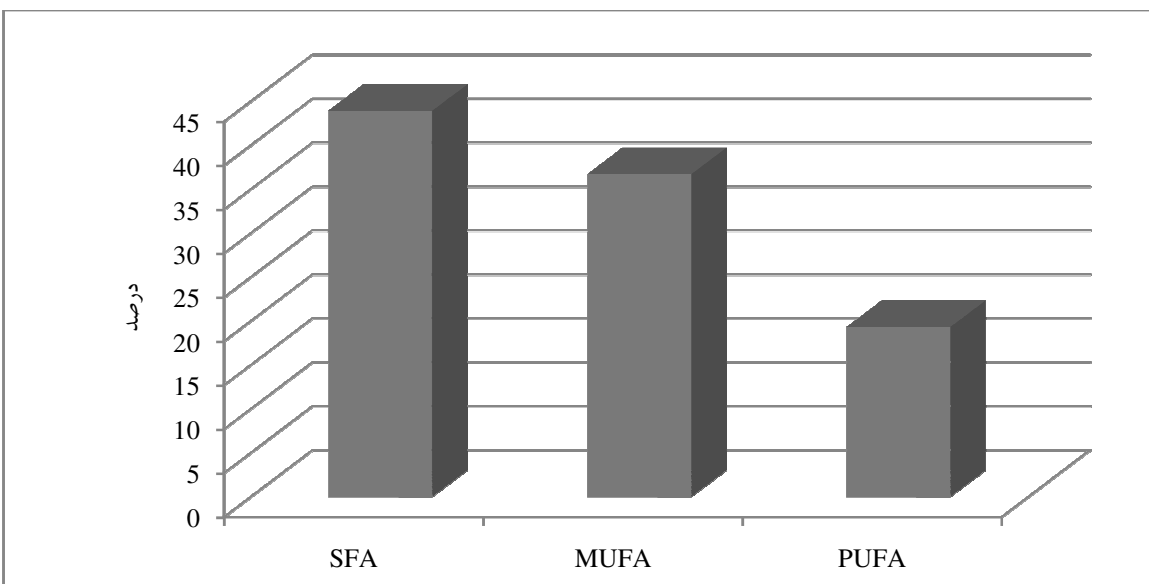
ج) آنالیزهای پتانسیل غذایی

۱- اسیدهای چرب

نتایج نشان داد که در گونه مورد بررسی از جنس دونا لیا میزان کل اسیدهای چرب ۲۱/۲۶ گرم درصد می باشد که ۱/۲۸ گرم درصد آن را امگا ۳ تشکیل می دهد که در که در کربن های C18: 3(ALA), C18: 4

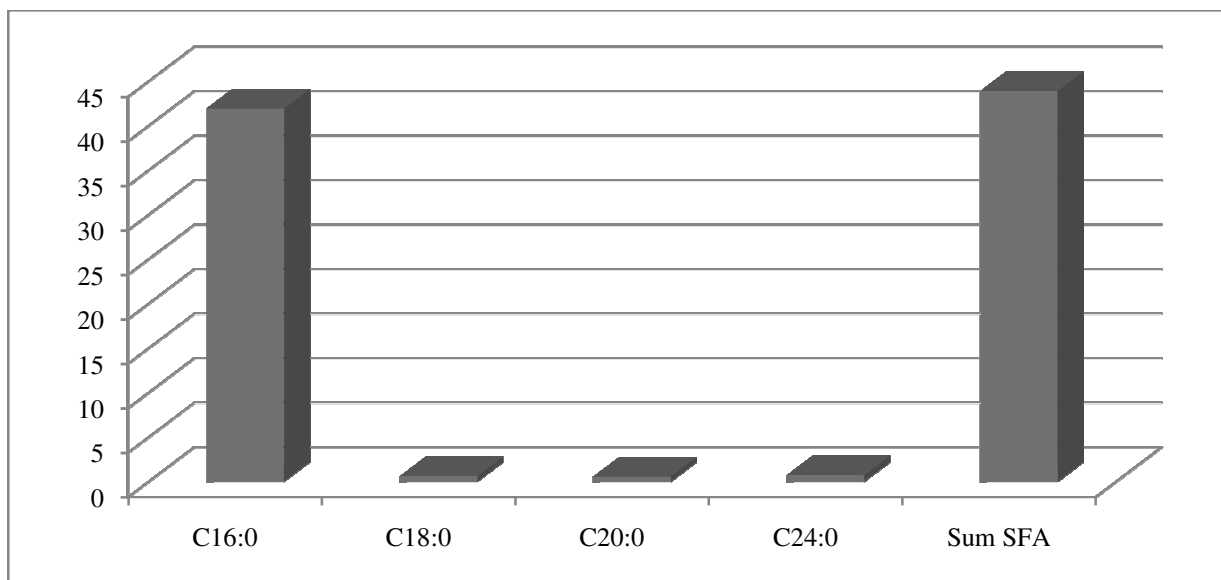
6: C24, 6: (DHA), C22: 6, C20:4(ETA), C20:3(ETE), (SDA) می باشد. میزان امگا ۶ (لینولئیک اسید) در این گونه ۲/۴۹ گرم در صد است. از کل اسیدهای چرب میزان کل اسیدهای چرب اشباع شده ۴۳/۹۴٪ و مجموع اسیدهای چرب غیراشباع شده با یک پیوند دوگانه ۳۶/۷۳٪ و همین طور مجموع اسید چرب غیر اشباع با چند پیوند دوگانه ۱۹/۳۵٪ می باشد (شکل ۶). در بین اسیدهای چرب اشباع شده مورد بررسی (C18: 0, C16:0 C20: 0 C24: 0) بیشترین میزان مربوط به C16:0 (پالمیتیک اسید) است که ۴۱/۹۶٪ می باشد. و کمترین درصد ۵۹/۰٪ مربوط به ارشیدیک اسید (C20:0) است (شکل ۷).

از اسیدهای چرب غیر اشباع با یک پیوند دو گانه (MUFA) یعنی C18: 1, C20: 1, C22: 1, C24: 1 بیشترین میزان ۱۶/۴۷٪ بوده که مربوط به (18: 1) می باشد. میزان نروونیک اسید Nervonic acid;C24:1 در این گونه ۰٪ است (شکل ۸). در بین اسیدهای چرب غیر اشباع با چند پیوند گانه ، لینولئیک اسید C18: 2 (n-6) بیشترین درصد ۱۱/۷۱٪ را دارد. و کمترین میزان مربوط به لینولنیک اسید C18: 3(n-3) با مقدار ۱۲۲/۰٪ می باشد (شکل ۹) و درصد DHA در این گونه ۱/۷۶ درصد می باشد. پروفیل کل اسیدهای چرب در شکل ۱۰ نشان داده شده است.

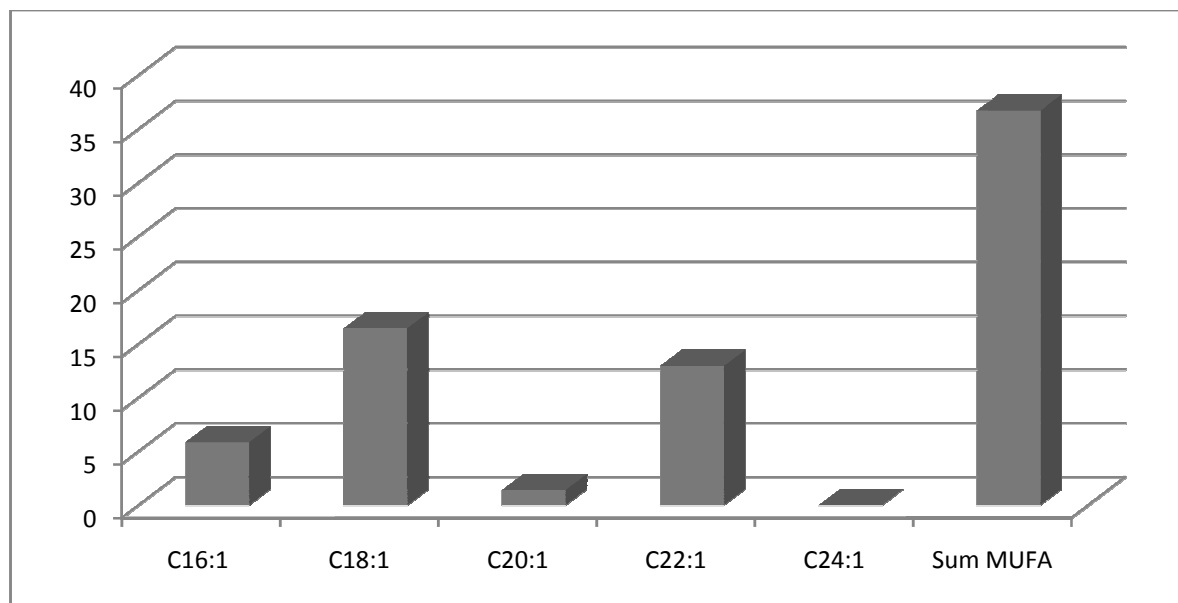


شکل ۶: درصد کل اسیدهای ^۱چرب اشباع شده، ^۲اشباع نشده با یک پیوند دوگانه و ^۳اشباع نشده با چند پیوند دوگانه در گونه *Dunaliella cf. bardawil* جدا شده از سواحل چابهار

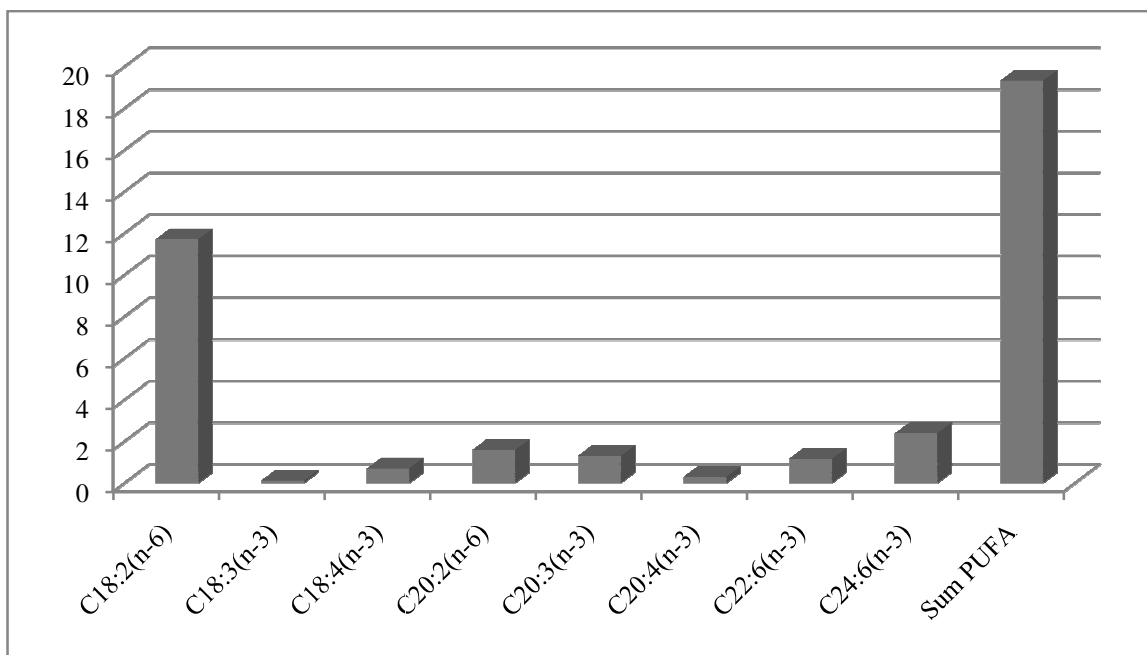
^۱saturated fatty acids: SFA; ^۲Mono unsaturated fatty acids: MUFA; ^۳Polyunsaturated fatty acids: PUFA



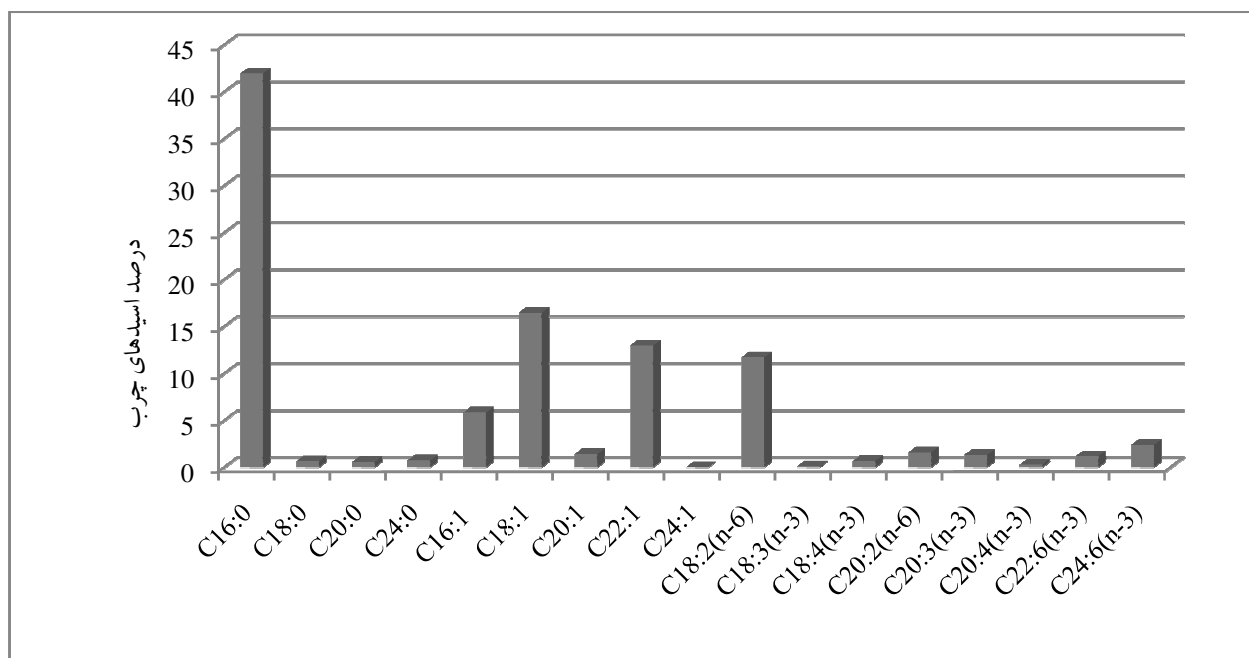
شکل ۷: درصد انواع اسیدهای چرب اشباع شده، در گونه *Dunaliella cf. bardawil* جدا شده از سواحل چابهار



شکل ۸: درصد انواع اسیدهای چرب اشباع نشده با یک پیوند دوگانه در گونه *Dunaliella cf. bardawil* جدا شده از سواحل چابهار



شکل ۹: درصد انواع اسیدهای چرب اشباع نشده با چند پیوند دوگانه در گونه *Dunaliella cf. bardawil* جدا شده از سواحل چابهار

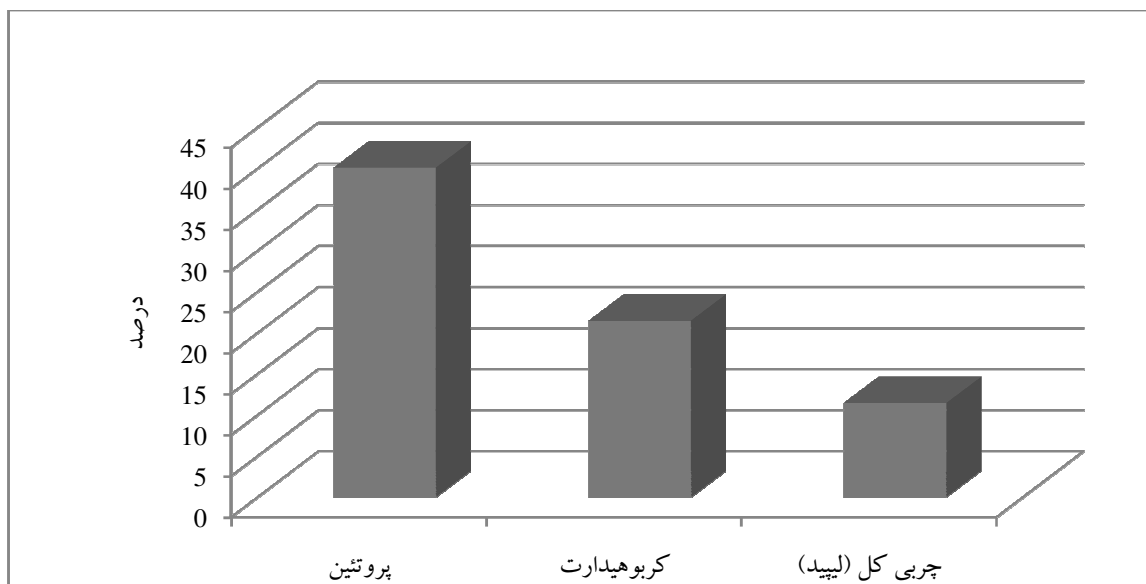


شکل ۱۰: پروفیل اسیدهای چرب در گونه *Dunaliella cf. bardawil* جدا شده از سواحل چابهار

۲- کربوهیدرات، پروتئین، چربی کل

نتایج اندازه گیری میزان چربی کل پروتئین و کل کربوهیدرات در گونه دونالیا بارداول نشان داد که پروتئین بیشترین میزان را به خود اختصاص (۴۰/۱۲٪) و کمترین درصد مربوط به کل لیپید با میزان ۱۱/۵٪

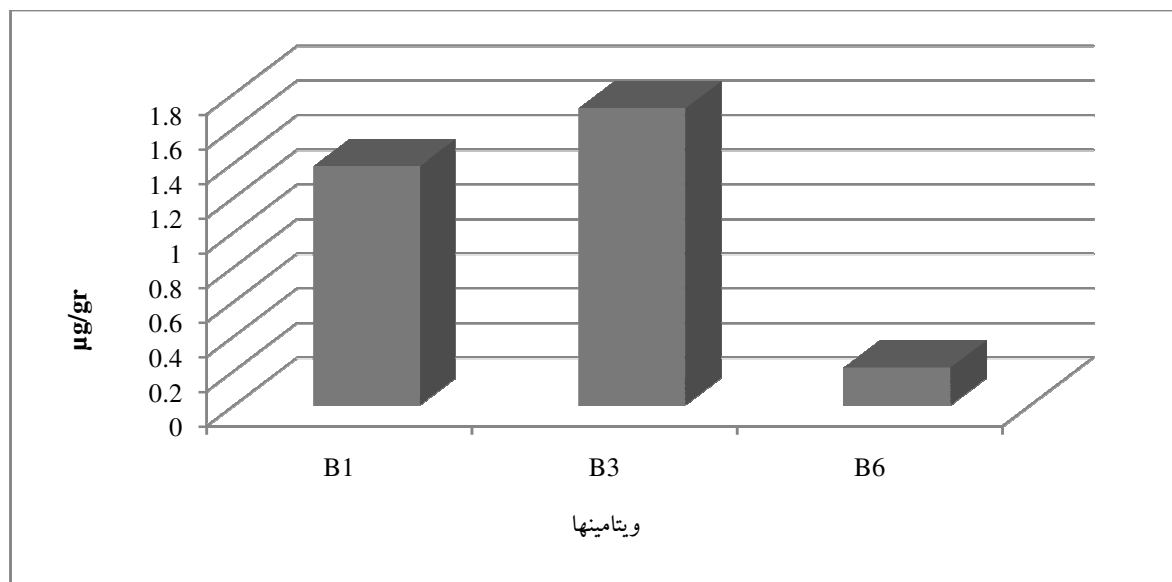
می باشد (شکل ۱۱)



شکل ۱۱: درصد کل چربی، پروتئین و کربوهیدرات اندازه گیری شده در گونه *Dunaliella cf. bardawil* جدا شده از سواحل چابهار

۳- ویتامین ها

تنها ویتامینهایی که میزان آن برای کل گونه ها در این پروژه تعیین گردید شامل برخی از ویتامینهای محلول در آب مانند B1, B3, B6 بوده است. اگر چه هدف از انجام این قسمت از پروژه حاضر تعیین میزان انواع ویتامینهای محلول در چربی و آب بوده است ولی کل ویتامینهای محلول در چربی مانند A, E, D, K در کل گونه ها با استفاده از دستگاه HPLC به صورت ND= Not detectable نشان داده شد که با وجود درخواست تکرار آزمایش نتایج یکسان نشان داد بنا بر این نتایج فقط برای سه نوع ویتامین ذکر شده در شکل ۱۲ آورده شده است. بقیه ویتامین ها لازم است که مجددا در این گونه ها بررسی و تعیین گردد.



شکل ۱۲: میزان برخی از ویتامینهای محلول در آب بر حسب میکروگرم بر گرم در گونه *Dunaliella cf. bardawil* جدا شده از سواحل چابهار

2- *Ochromonas cf. malhamensis*

الف) آنالیز های مورفولوژی و مولکولی گونه

این گونه با موفقیت جدا سازی و خالص گردید و به حجم بالا هم رسید سه ایزوله متفاوت از این جنس جدا شد و از آنجایی که آنالیز های مولکولی دو ایزوله بیشتر شباهت زنتیکی نسبت به ایزوله سوم نشان دادند بنا بر این دو ایزوله مورد بررسی پتانسیل غذایی قرار گرفتند.

طبقه بندی این گونه ان به صورت زیر است:

Phylum *Ochrophyta* (Cavalier-Smith, 1986) Cavalier-Smith, 1995

Class *Chrysophyceae* Pascher, 1914

Order *Chromulinales* Pascher, 1910b

Family *Chromulinaceae* Engler, 1897

Genus *Ochromonas* Vysotskii, 1887

از این گونه سه استرین طی جدا سازی در زمانهای متفاوت جدا و خالص سازی گردید. استرینها از نظر مورفولوژی و رنگ آنها در محیط کشت تفاوت اندکی داشتند. نام گذاری استرینها به صورت زیر مانند گونه قبلی انجام شد.

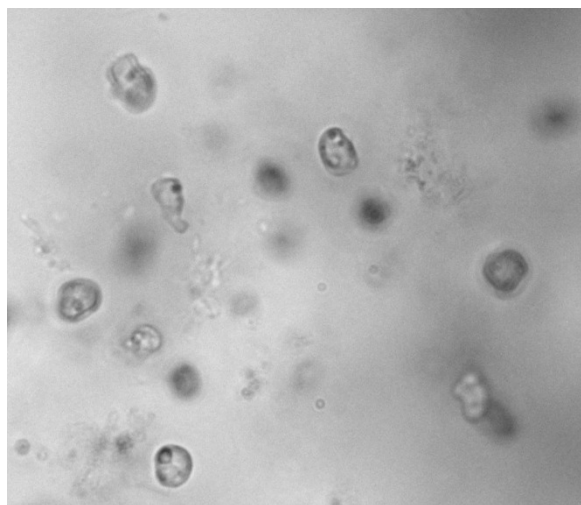
نام استرینها: CHPO1, CHPO2, CHPO3

شماره ثبت در بانک ژن:

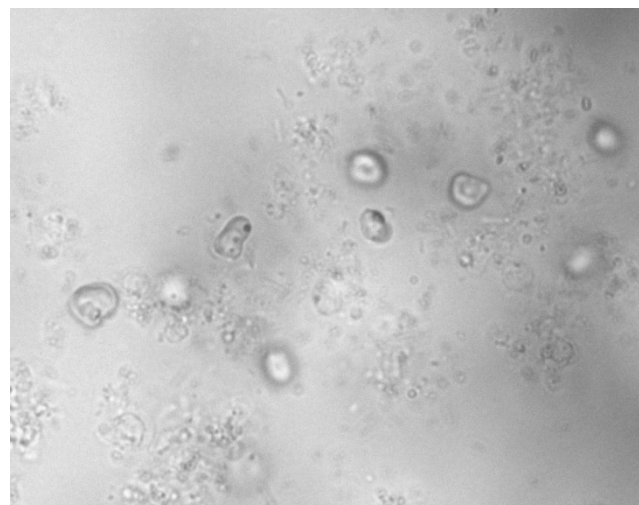
سایز گونه: طول ۱۰/۸ - ۱۰ میکرومتر: عرض ۹/۲ - ۸/۷

رنگ استرین خالص شده: قهوه ای روشن

بررسی مورفولوژی گونه نشان داد این گونه تک سلولی و بیضی متمایل به گرد که در قسمت انتاپکس گرد است و در قسمت اپکس که دو فلاژلا دارد و پهن تر است. این گونه کلروپلاست بشقابی دارد که در شکل‌های گرفته شده برای این گونه زیاد مشخص نمی باشد (شکل ۱۳) رنگ طلایی متمایل به سبز-قهوه ای می باشد. ساینز گونه ایرانی بین $10/8 - 10$ (طول)، $9/2 - 8/7$ (عرض) میکرومتر می باشد. گونه از نظر مورفولوژی شبیه *Chlamydomonas* می باشد ولی آنالیزهای مولکولی گونه انرا از این گونه دور کرد. رنگ استرین قهوه ای می باشد و سلول ان به رنگ قهوه ای طلایی دیده می شود. گونه به روش رقیق سازی جدا گردید کشت روی آگار و روش های دیگر برای جدا سازی این گونه موثر نبود استرین های ایرانی در محیط F2 به خوبی رشد کردند استفاده از محلول استخراج شده خاک رشد انرا تسریع می کند. گونه های این جنس در محیط کشت به شکل‌های مختلف مشاهده می وند (شکل ۱۳).



(ب) ایزوله CHPO1



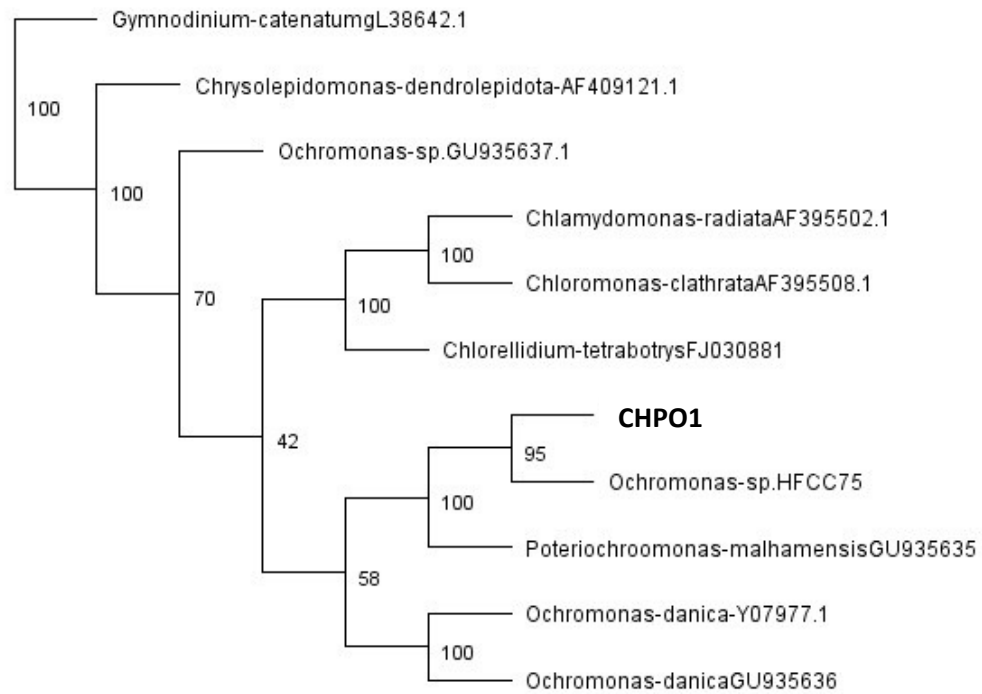
(الف) ایزوله CHPO3

شکل ۱۳: گونه اکروموناس *Ochromonas sp.* جدا شده از سواحل چابهار

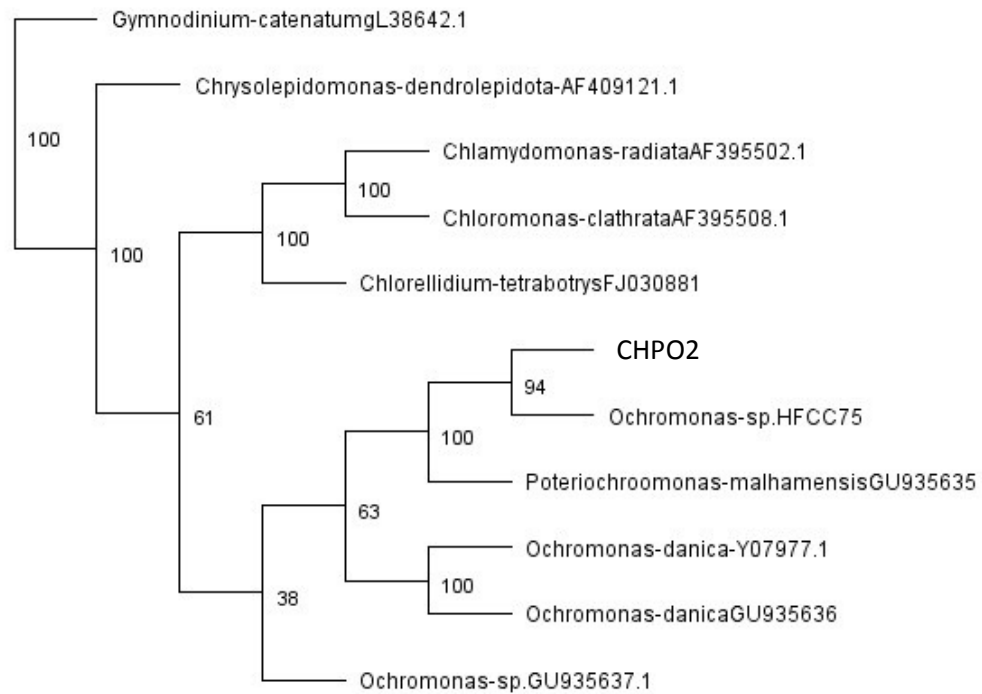
نتایج آنالیزهای مولکولی نشان سه استرین ایرانی شباهت بسیار نزدیک به گونه ای از *Ochromonas* دارد و میتواند در این جنس قرار بگیرد ولی گونه آن مشخص نگردید. روابط خویشاوندی تک تک استرینها با استفاده از آنالیزهای مولکولی ابتدا بررسی گردید (شکل ۱۴) و نشان داد استرینهای ایرانی هر سه با گونه *Ochromonas sp.* رابطه خویشاوندی نزدیکی دارند در شکلهای ۱۴ الف-ج آنالیزهای مربوط به هر سه گونه آورده شده است. سپس آنالیز مولکولی هر سه ایزوله با هم با دو روش مختلف انجام شد (شکلهای ۱۵-۱۶) و نشان داد که هر سه گونه از نظر توالی ژنی مشابه هستند در یک آنالیز با ۱۰۰ درصد بوت استرپ حمایت می شوند شکل (۱۵) و در آنالیز انجام شده در شکل ۱۶ حمایت بوت استرپ برای سه گونه ۱۰۰ درصد ولی برای دو استرین ۲ و ۳ با ۱ تقریباً ضعیف (۵۵٪) می باشد (شکل ۱۶). تمام گونه هایی که توالی ژنی مشابه داشتند و در بانک ژن در ناحیه مورد بررسی ثبت شده بودند و در این آنالیزها استفاده گردیده و همراه با شماره ثبت ژنی آنها در جدول ۳ آورده شده است.

جدول ۳: اسامی گونه هایی که در آنالیز مولکولی گونه *Ochromonas* همراه با شماره های ثبت ژنی آنها

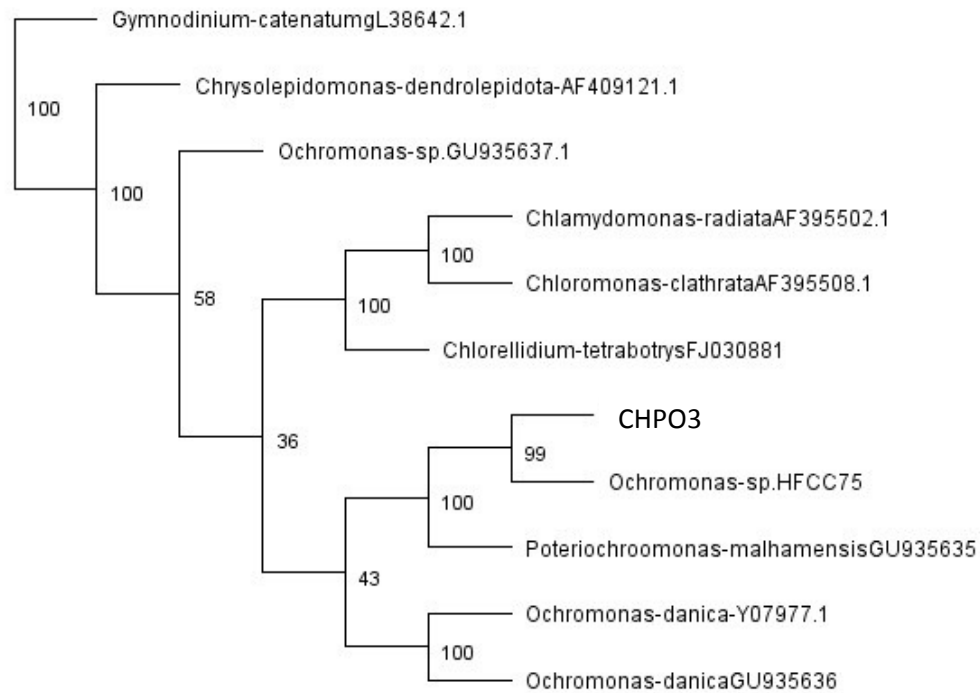
نام گونه	GenBank no
<i>Ochromonas</i> -sp CHPO1	Present study
<i>Ochromona</i> -sp CHPO2	Present study
<i>Ochromonas</i> -sp CHPO3	Present study
<i>Ochromonas</i> sp.	HFCC75
<i>Chrysolepidomonas dendrolepidota</i>	AF409121
<i>Chlorellidium tetrabotrys</i>	FJ030881
<i>Ochromonas danica</i>	Y07977
<i>Ochromonas danica</i>	GU935636
<i>Ochromonas</i> sp.	GU935637
<i>Poteriochroomonas malhamensis</i>	GU935635
<i>Chloromonas clathrata</i>	AF395508
<i>Chlamydomonas radiata</i>	AF395502
<i>Gymnodinium catenatum</i>	L38642



(شكل الف)

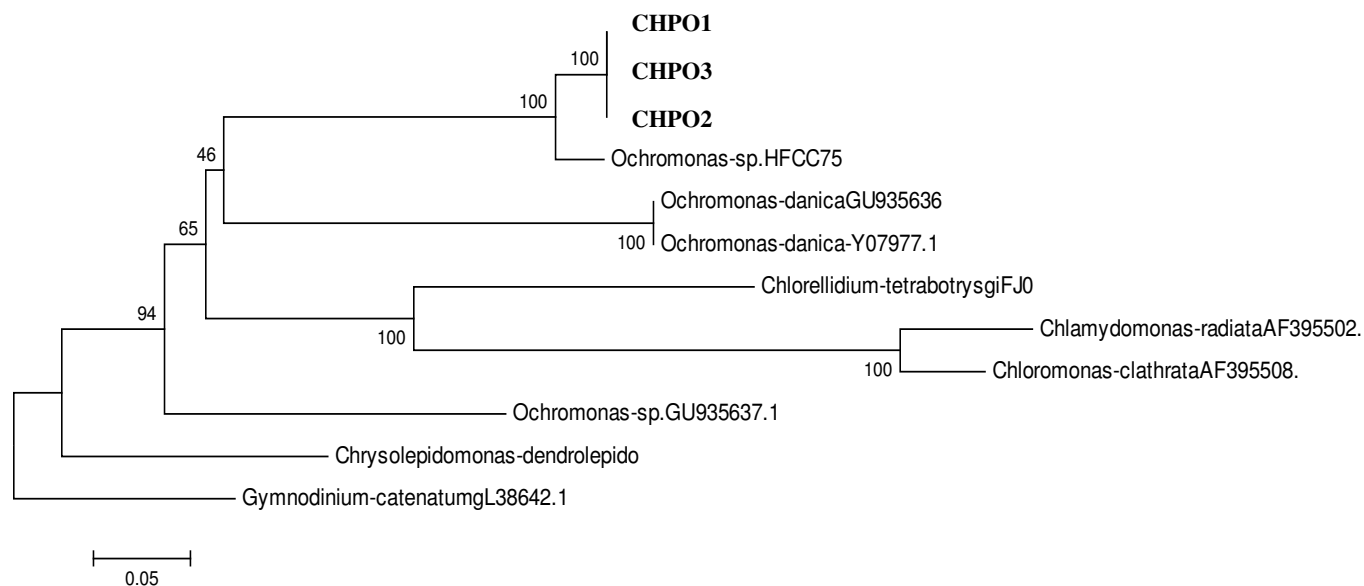


(شکل ب)

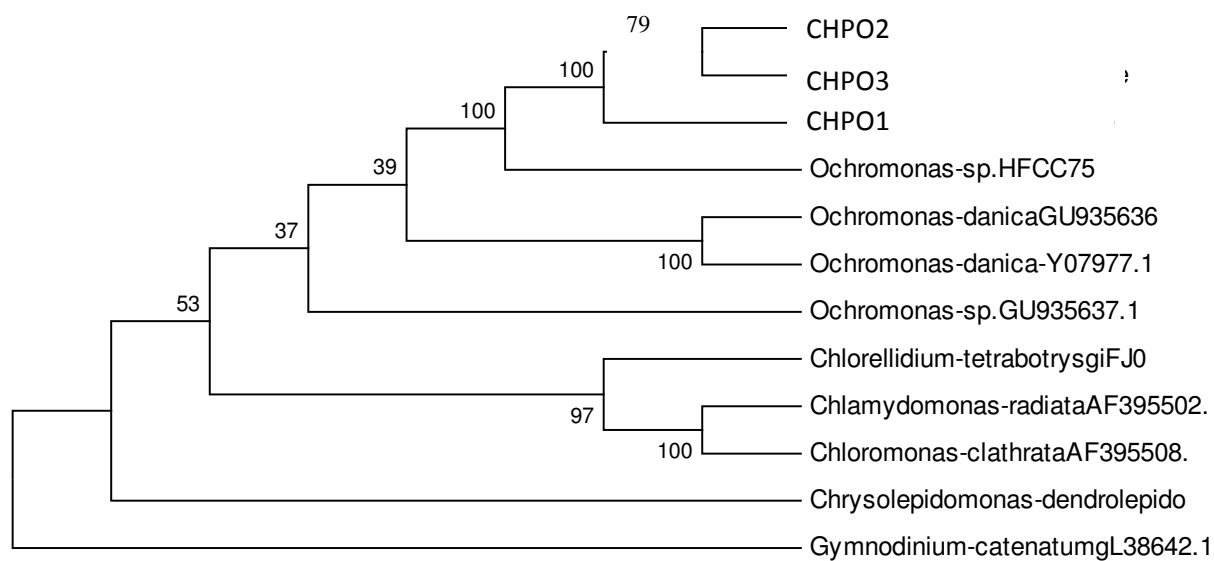


(شکل ج)

شکل ۱۴: درخت فیلوژنی متعلق به گونه *Ochromonas sp* خالص شده از سواحل چابهار،
 استرین CHPO1 (شکل الف) استرین CHPO2 (شکل ب) و استرین CHPO3 براساس توالی ژنی در قسمتی از
 ناحیه LSU با استفاده از آنالیز NJ مدل Jukes cantor Tajima-Nei اعداد bootstrap را بر اساس 10^۰ replication
 نشان می دهند. *Gymnodinium catenatum* به عنوان *outgroup* انتخاب گردید.



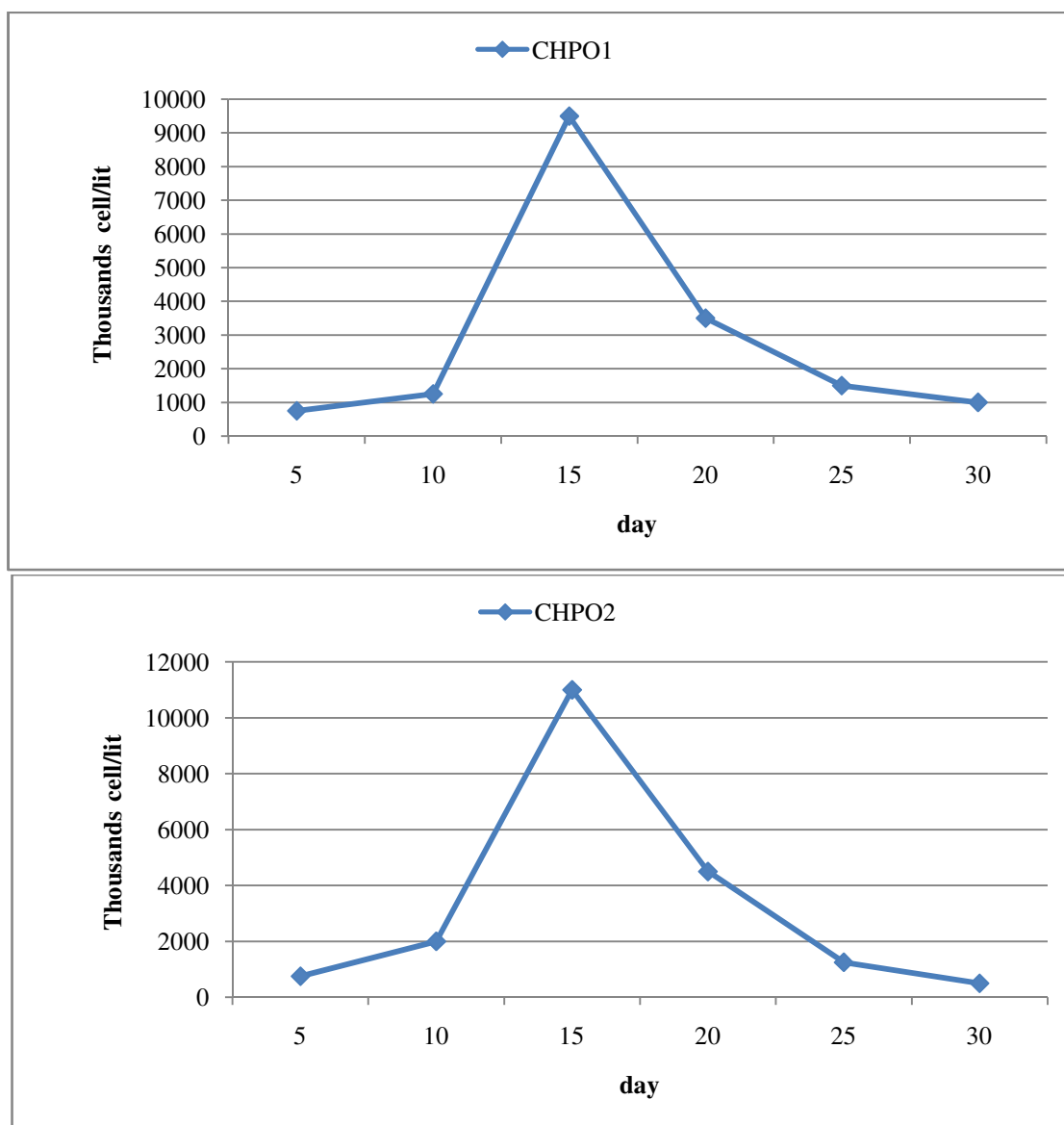
شکل ۱۵: درخت فیلوژنی سه استرین ایرانی متعلق به گونه *Ochromonas* sp براساس توالی ژنی در قسمتی از ناحیه LSU با استفاده از آنالیز Maximum Likelihood (ML) مدل Jukes cantor الگوی ml Heuristics انتخاب گردید. اعداد bootstrap را بر اساس 1000 replication نشان می دهند. *Gymnodinium catenatum* به عنوان *outgroup* انتخاب گردید.



شکل ۱۶: درخت فیلوژنی استرین های CHPO1, CHPO2, CHPO3 براساس توالی ژنی در قسمتی از ناحیه LSU با استفاده از آنالیز Maximum parsimony (mp) مدل Max-Mini Branch-Bound اعداد bootstrap را بر اساس replication 1۰00 نشان می دهند. *Gymnodinium catenatum* به عنوان outgroup انتخاب گردید.

ب) رشد نسبی

شکل های ۱۷ میزان رشد نسبی استرینهای گونه را نشان می دهد همانطور که در شکل مشخص شده است میزان رشد گونه از روز ۵ تا روز ۱۵ بیش از ۱۰ برابر می رسد و از ۱ میلیون سلول در لیتر به ۱۰ میلیون (استرین اول) و ۱۲ میلیون سلول در لیتر در استرین دوم می رسد. که نشان دهنده رشد سریع گونه می باشد.



شکل ۱۷: رشد نسبی گونه اکرومونات جدا شده از سواحل چابهار استرین های ۱ و ۲

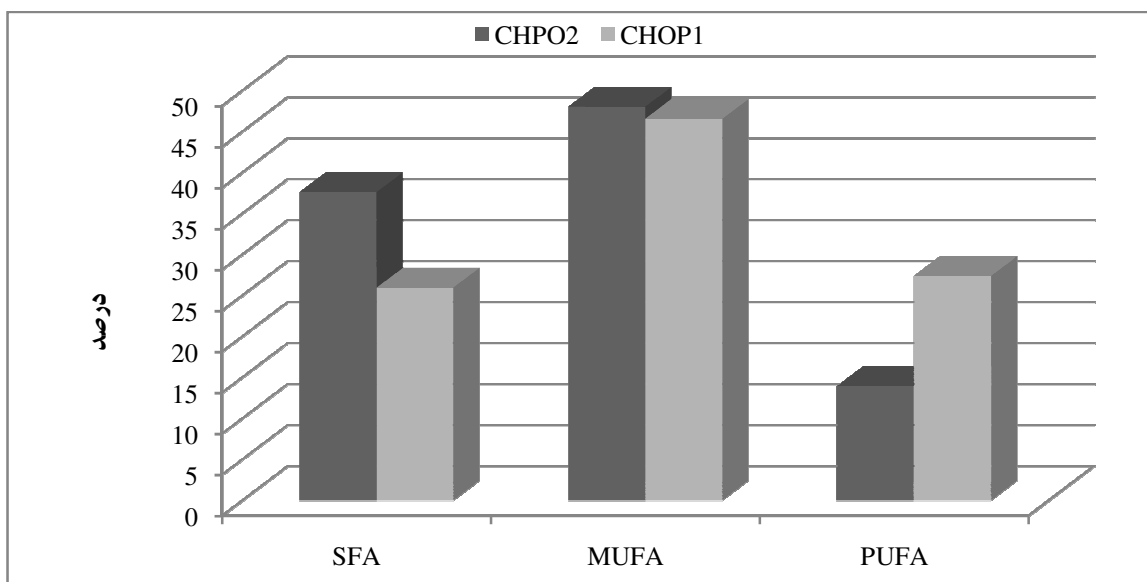
ج) بررسی ارزش غذایی

۱- اسیدهای چرب

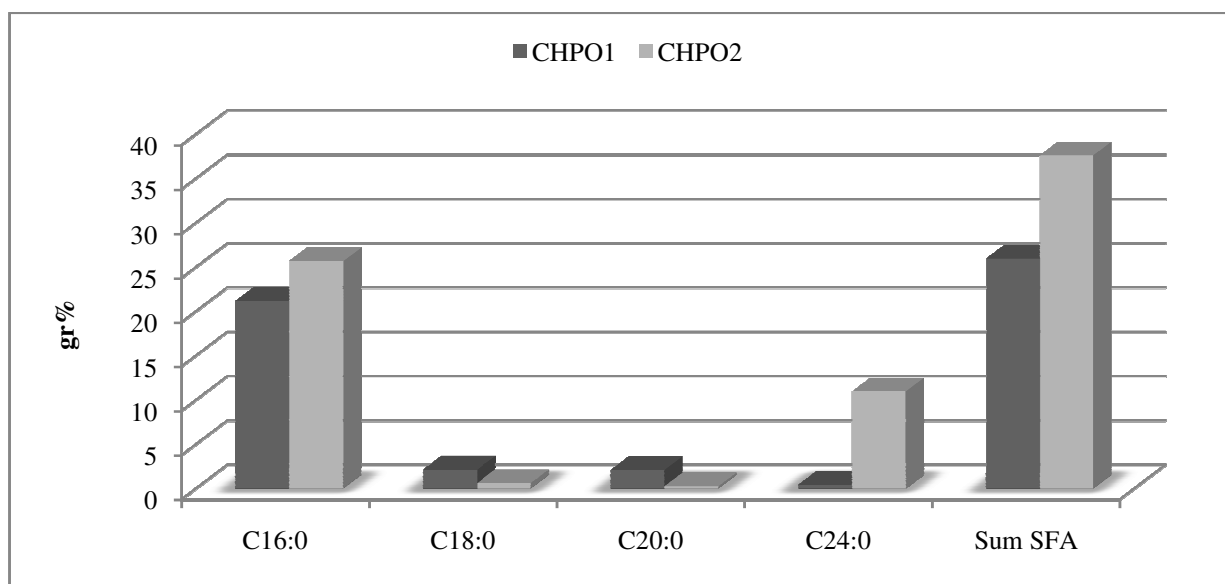
میزان کل اسید چرب در گونه *Ochromonas sp.* در ایزوله اول (CHPO1) ۱۹/۳۰۴ گرم درصد می باشد. که از این مقدار ۲/۳۴ گرم درصد آن امگا ۳ می باشد که بیشترین میزان امگا ۳ مربوط به لینولنیک اسید (LLA) است. اسیدهای چرب اشباع شده (SFA) ۲۵/۹۹٪ از کل اسیدهای چرب را تشکیل می دهد (شکل ۱۸) که بیشترین مقدار آن مربوط به پالمیتیک اسید (C16:0) با ۲۱/۲۱ درصد و (C24:0) با میزان ۰/۴۷ درصد کمترین مقدار آن را تشکیل می دهد (شکل ۱۹). اسیدهای چرب غیر اشباع با یک پیوند دوگانه (MUFA) ۴۶/۶٪ از کل اسیدهای چرب را تشکیل می دهند که بیشترین مقدار مربوط به (C18:1) با میزان ۲۳/۹٪ و کمترین مربوط به پالمیتولنیک اسید C16:1 با مقدار ۰/۱۲۴٪ می باشد (شکل ۲۰). اسید اشباع با چند پیوند دو گانه (PUFA) ۲۷/۴ درصد از کل اسیدهای چرب را تشکیل می دهند و اسید لینولنیک بیشترین مقدار (۱۳/۹ درصد) آن را تشکیل می دهد و کمترین مقدار مربوط به ایکوزادینوئیک اسید C20: 2 با مقدار صفر درصد می باشد. میزان دو کوزاهگزانوئیک اسید (DHA) در این گونه ۰/۳۳ درصد از کل اسیدهای چرب غیر اشباع به پیوند چند گانه را تشکیل می دهد (شکل ۲۱).

میزان کل اسید چرب اشباع در ایزوله دوم (CHPO2) ۳۰/۰۶۲ گرم درصد می باشد که ۰/۸۳۶ گرم درصد آنرا امگا ۳ تشکیل می دهد. میزان کل اسیدهای چرب اشباع شده ۳۷/۶۳ درصد می باشد که نسبت به ایزوله اول بیشتر است در این ایزوله هم بیشترین میزان متعلق به اسید پالمیتیک با ۲۵/۷۱ درصد است. ۴۸/۰۵۳ درصد از کل اسیدهای چرب متعلق به اسیدهای چرب اشباع با یک پیوند دو گانه است که کمترین آن را اسید پالمیتولنیک و بیشترین مقدار آن ها مربوط به اسید اولئیک (۱۸:۱) می باشد که در شکل ۲۰ مشخص است.

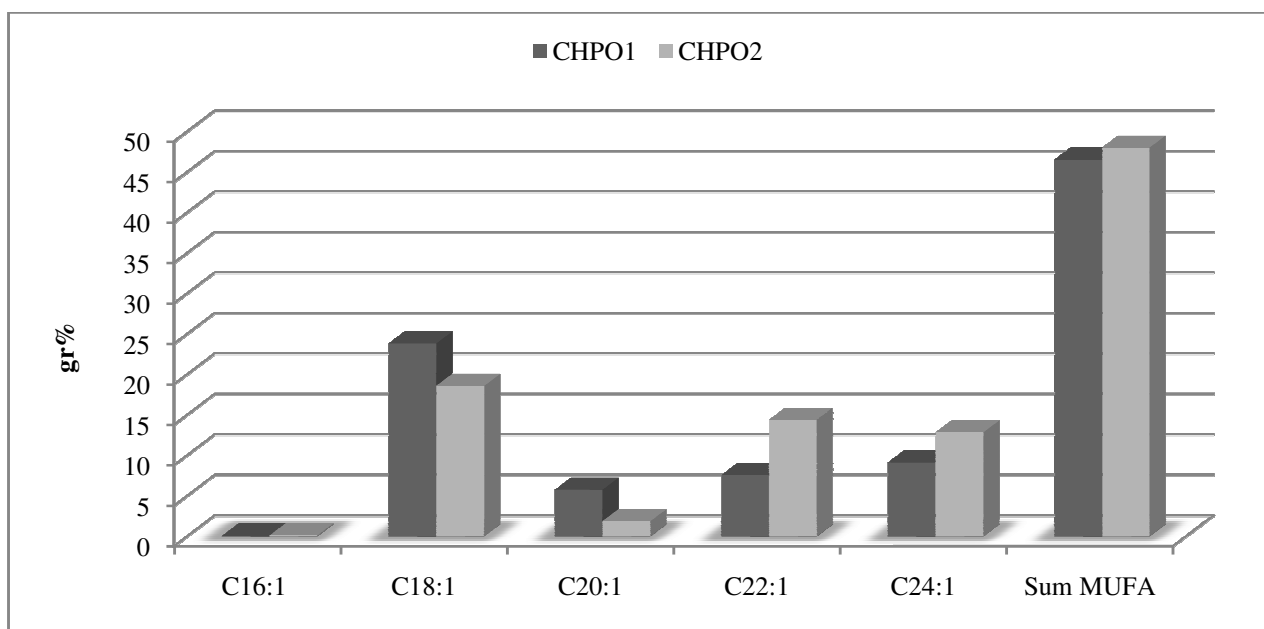
اسیدهای چرب اشباع با چند پیوند دو گانه ۱۴/۳۱ درصد از کل اسیدهای چرب را به خود اختصاص داده است که بیشترین مقدار آن (۱۱/۲٪) متعلق به اسیدلینولئیک (C18:2) و کمترین مقدار آن را مانند استرین اول اسید ایکوزادینوئیک (۰٪) تشکیل می دهد (شکل ۲۱). در شکل ۲۲ پروفیل اسیدهای چرب دو ایزوله مقایسه شده است.



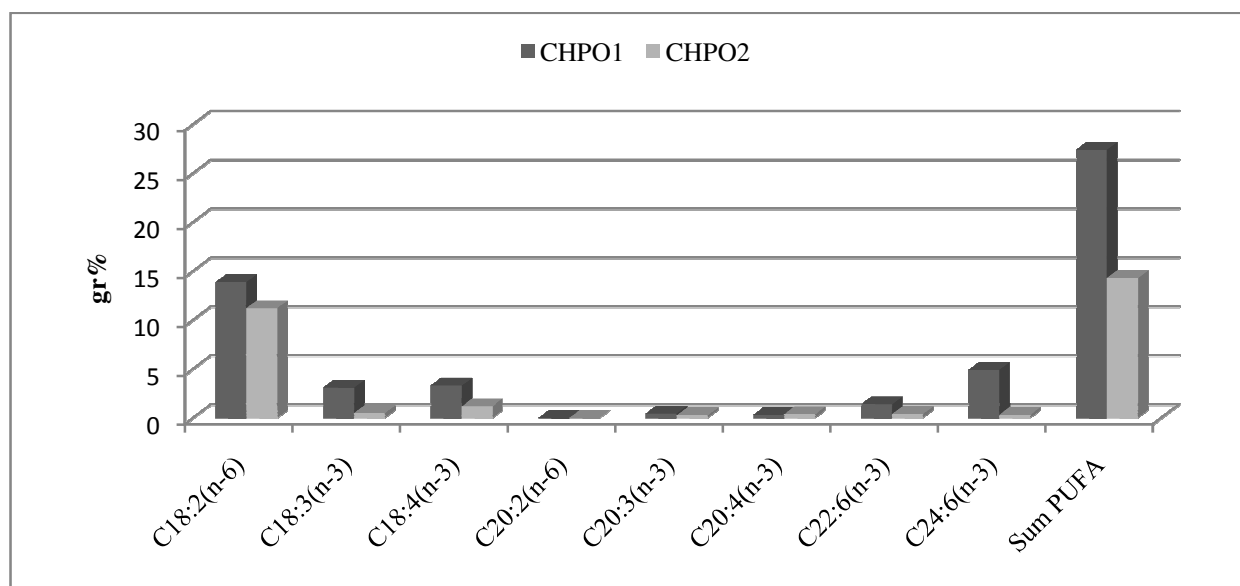
شکل ۱۸: مقایسه درصد کل اسیدهای اچرب اشباع شده (SFA)،^۲ اشباع نشده با یک پیوند دو گانه (MUFA) و^۳ اشباع نشده با چند پیوند دو گانه (PUFA) در دو ایزوله (CHPO1 , CHPO2) گونه *Ochromonas sp.* جدا شده از سواحل سیستان و بلوچستان



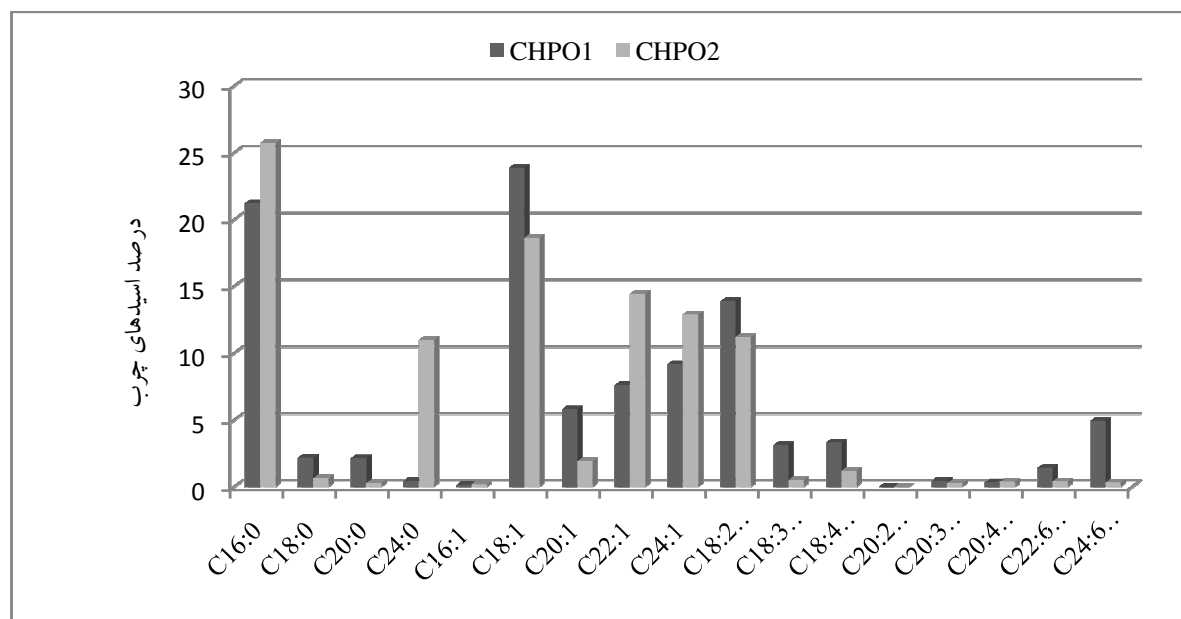
شکل ۱۹: درصد انواع اسیدهای چرب اشباع شده در ایزوله های CHPO1 و CHPO2 گونه اکرومونات جدا شده از سواحل چابهار



شکل ۲۰: درصد انواع اسیدهای چرب اشباع شده با یک پیوند دو گانه در ایزوله های CHPO1 و CHPO2 گونه اکرومونات جدا شده از سواحل چابهار



شکل ۲۱: درصد انواع اسیدهای چرب اشباع شده با چند پیوند دو گانه در ایزوله های CHPO1 و CHPO2
گونه اکرومونات جدا شده از سواحل چابهار



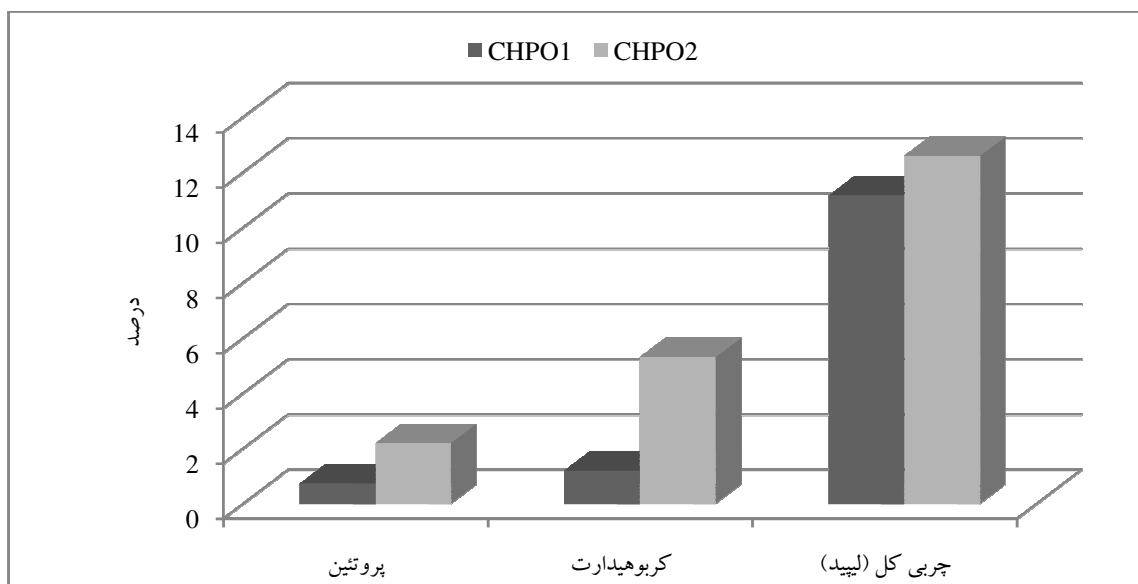
شکل ۲۲: مقایسه پروفیل اسیدهای چرب در دو ایزوله از گونه *Ochromonas sp.* جدا شده و خالص از سواحل استان سیستان و بلوچستان

۲- کربوهیدرات، پروتئین و چربی کل

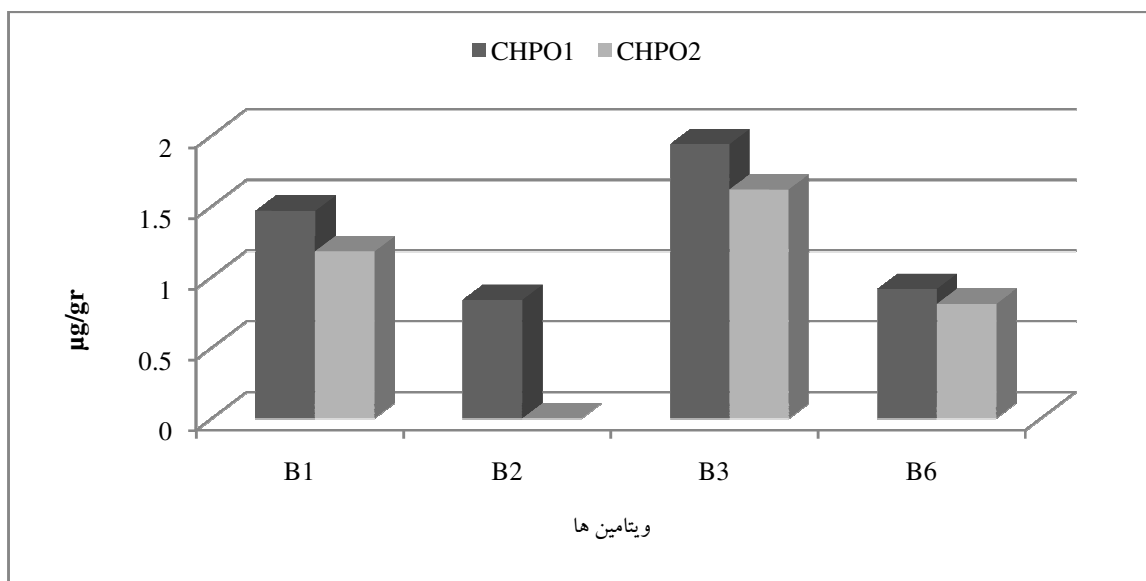
نتایج بررسی کربوهیدرات، پروتئین و چربی کل در دو استرین ایرانی نشان داد در دو استرین که نماینده دو گونه از اکرومونات هستند با هم تفاوت دارد و در ایزوله دوم (CHPO2) مقادیر بالاتری را به خود اختصاص داده است. میزان پروتئین در ایزوله اول (CHPO1) ۰/۷۳٪ و در ایزوله دوم ۲/۱۶٪ می باشد. کربوهیدرات در ایزوله اول ۱/۲٪ و در ایزوله دوم ۵/۳۲٪ تعیین گردید. میزان لیپید در استرین اول ۱۱/۱۶٪ و در استرین دوم ۱۲/۶٪ ثبت گردید (نمودار ۲۳)

۳- ویتامین ها

نتایج بررسی ویتامینها در دو ایزوله اکرومونات نشان داد که برخی ویتامینهای محلول در آب در استرین اول گونه اکرومونات بالاتر است و تنها گونه ای که در این بررسی حاوی ویتامین B2 قابل اندازه گیری بود ایزوله اول گونه اکرومونات بود که میزان آن در این ایزوله ۰/۸۴٪ ثبت گردید از میان بقیه ویتامین های قابل اندازه گیری ویتامین بیشترین میزان مربوط به ویتامین B3 که در ایزوله اول ۱/۹۴٪ و در ایزوله دوم ۱/۶۲٪ درصد ثبت گردید (شکل ۲۴)



شکل ۲۳: مقایسه درصد چربی کل، کربوهیدرات و پروتئین در دو ایزوله (CHPO1, CHPO2) گونه *Ochromonas sp.* جدا سازی و خالص شده از سواحل چابهار



شکل ۲۴: مقایسه برخی ویتامین های محلول در آب در دو ایزوله (CHPO1, CHPO2) گونه *Ochromonas sp.* جدا شده از سواحل سیستان و بلوچستان

3- *Amphora var. coffeiformis*

این گونه از سواحل چابهار جدا سازی و خالص شد ولی به حجم انبوه بالا نرسید بنا بر این پتانسیل غذایی گونه بررسی نگردید.

الف) آنالیزهای ریخت شناسی و مولکولی

طبقه بندی گونه به شرح زیر می باشد:

Phylum *Ochrophyta* (Cavalier-Smith, 1986) T. Cavalier-Smith, 1995

Subphylum *Diatomeae* (Dumortier, 1821) Cavalier-Smith, 1995 - diatoms

Class *Bacillariophyceae* Haeckel, 1878 - raphid. pennate diatoms

Subclass *Bacillariophycidae* (Haeckel, 1878) Mann, 1990

Order *Thalassiosiphales* Mann, in F.E. Round et al., 1990

Family *Catenulaceae* Mereschkowsky, 1902

Genus *Amphora* Ehrenberg, 1840

از این گونه یک استرین خالص سازی گردید.

نام استرین: CHPA1

شماره ثبت در بانک ژن:

سایز گونه: ۲۵ - ۱۸ میکرومتر طول، ۳ - ۲/۵ میکرومتر عرض

رنگ: قهوه ای روشن

بررسی نتایج نشان داد که گونه از نظر مورفولوژی به گونه امفورا شباهت دارد سلولها از نظر رنگ به رنگ

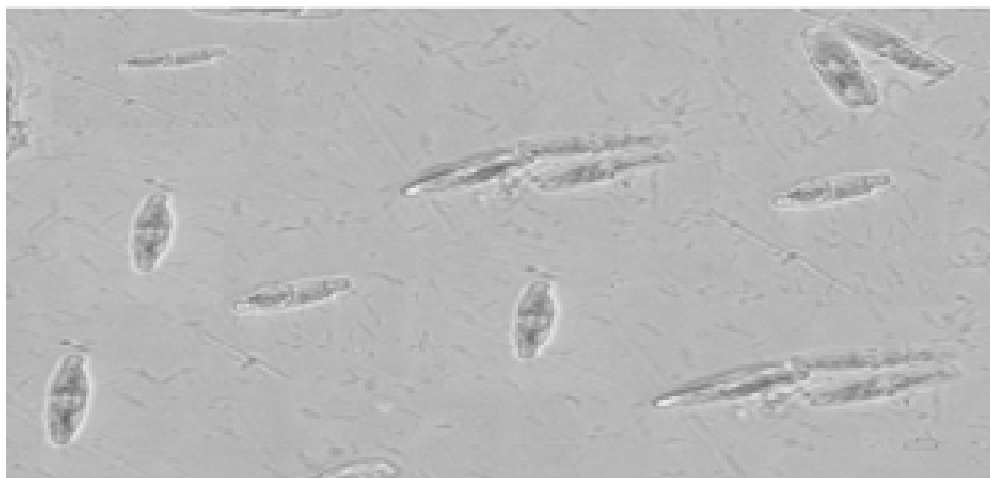
طلایی قهوه ای می باشند و از نظر اندازه طول آن ۲۵ - ۱۸ میکرومتر و عرض آن بین ۳ - ۲/۵ می باشد.

این گونه از سطح شکمی صاف تا کمی برآمده و از سطح پشتی برآمده است. در دو قسمت انتهایی

(axial area) باریک تر شده و در دو انتها گرد می شود. این گونه از نظر مورفولوژی ه بیشترین شباهت را به *A.*

coffeaformis دارد. شکل ۲۵ مورفولوژی گونه ایرانی را نشان می دهد شبیه گونه *A. normanii* است ولی این

گونه از گونه های آب شیرین است.



شکل ۲۵ : گونه *A. cf. coffeaformis* جدا و خالص شده از سواحل خلیج چابهار

جدول ۴: لیست گونه هایی که در آنالیز مولکولی گونه امفورا استفاده شده است

نام گونه	GenBank NO.
<i>Amphora cf. coffeaeformis</i>	مطالعه حاضر
<i>Amphora coffeaeformis</i>	AF417682
<i>Amphora sp.</i>	FJ214167
<i>Amphora sp.</i>	FJ214169
<i>Amphora sp.</i>	FJ214161
<i>Amphora normanii</i>	AM710512
<i>Pauliell taeniata</i>	AF417680
<i>Mayamaea atomus var. permitis</i>	AM710524
<i>Cymbella incerta</i>	HQ897245
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	FJ214166
<i>Craticula cuspidate</i>	AM710554
<i>Craticula importuna</i>	AM710533
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	DQ085807
<i>Cymbella minor</i>	HQ897255
<i>Cymbella lacustris</i>	HQ897251

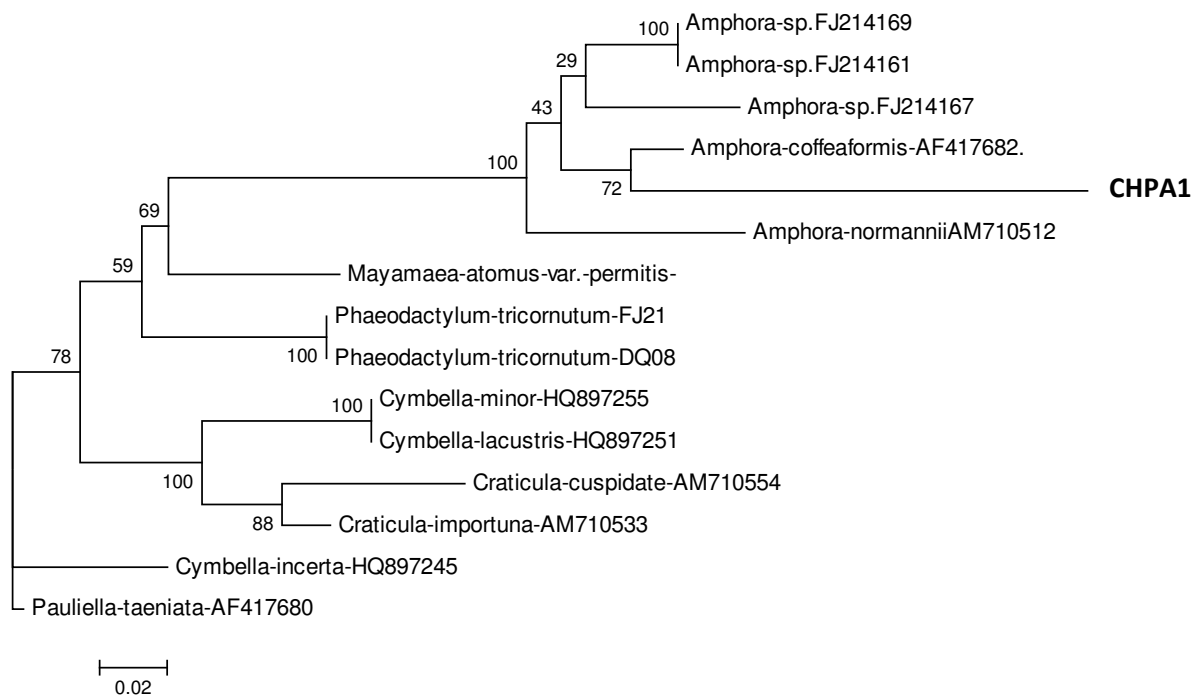
بررسی آنالیزهای مولکولی هم شناسایی را تایید کرد در جدول ۴ تمام گونه هایی که توالی ژنی آن ها در

منطقه موردنظر شبیه استرین ایرانی بود. هر دو نوع آنالیز مولکولی مورد استفاده نشان داد که گونه از نظر توالی

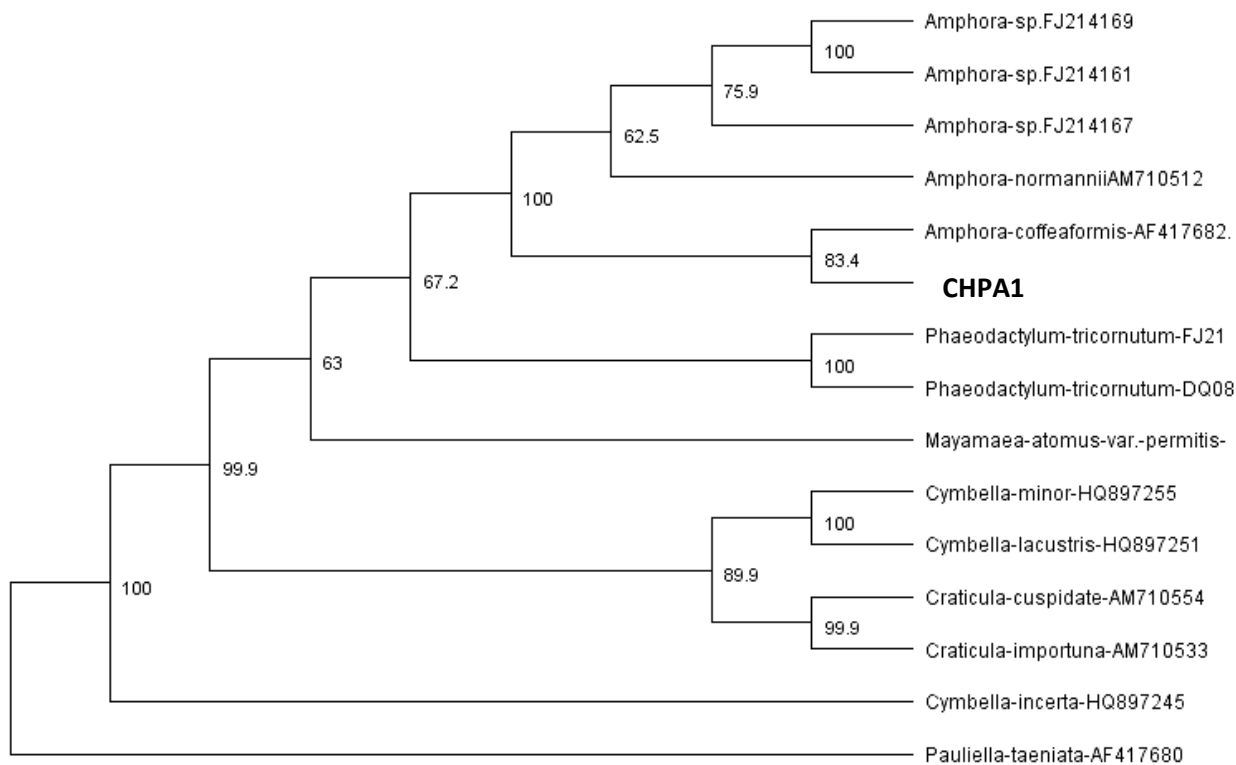
ژنی بیشترین شباهت به گونه *A. coffeaeformis* داشت. البته گونه های مشابه از نظر مورفولوژی *Cymbella* می

باشد . ولی بررسی مولکولی نشان داد استرین ایرانی از این گونه دورتر است و در هر دو آنالیز(شکلهای ۲۶-

۲۷) NJ, ML با 1000Bootstrap بیشترین رابطه خویشاوندی را با گونه امفورا کافی فورمیس دارد.



شکل ۲۶: درخت فیلوژنی *Amphora cf. coffeeaformis* استرین CHPA1 جدا شده از سواحل جنوب شرق ایران براساس توالی ژنی در قسمتی از ناحیه LSU با استفاده از آنالیز NJ مدل P distans و الگوی بین نسلیها به صورت homogenous انتخاب گردید. اعداد bootstrap را بر اساس ۱۰۰ replication نشان می دهند. گونه *Pauliella taeniata* به عنوان outgroup انتخاب گردید.



شکل ۲۷: درخت فیلوژنی گونه *Amphora coffeaformis* خالص شده از سواحل جنوب شرق ایران براساس

توالی ژنی در قسمتی از ناحیه LSU با استفاده از آنالیز مدل Maxi-Mini Branch and Bound (Mp). اعداد

bootstrap را براساس ۱۰۰۰ replication نشان می دهند. گونه *Pauliella taeniata*

به عنوان *outgroup* انتخاب گردید.

4- *Cylindrotheca closterium*

این گونه به حجم بالا نرسید بنا بر این پتانسیل غذایی گونه مورد بررسی قرار نگرفت

الف) بررسی ریخت شناسی و مولکولی

طبقه بندی گونه به شرح زیر است:

Phylum **Ochrophyta** (Cavalier-Smith, 1986) T. Cavalier-Smith, 1995
Subphylum **Diatomeae** (Dumortier, 1821) Cavalier-Smith, 1995 -
Class **Bacillariophyceae** Haeckel, 1878
Order **Bacillariales** Hendey, 1937
Family **Bacillariaceae** Ehrenberg, 1831
Genus **Cylindrotheca** Rabenhorst, 1859

نام استرین: CHPCY1

شماره ثبت در بانک ژن:

سایز گونه: ۲۰/۵۵ - ۱۵/۲ میکرومتر طول و ۳-۵ میکرومتر عرض

رنگ: قهوه ای

نتایج حاصل از مورفولوژی گونه *Cylidrotheca closterium* نشان داد که شناسایی گونه بر اساس ریخت

شناسی به راحتی امکان پذیر نمی باشد زیرا بسیار شبیه گونه *Nitzschia longissima* می باشد. گونه خالص سازی

شده در قسمت محور اپیکال کمی خمیده شده است (شکل ۲۸). اندازه آن بین ۱۶/۵۵ - ۱۵/۲ میکرومتر طول

و ۶ میکرومتر عرض پهن ترین قسمت آن است.

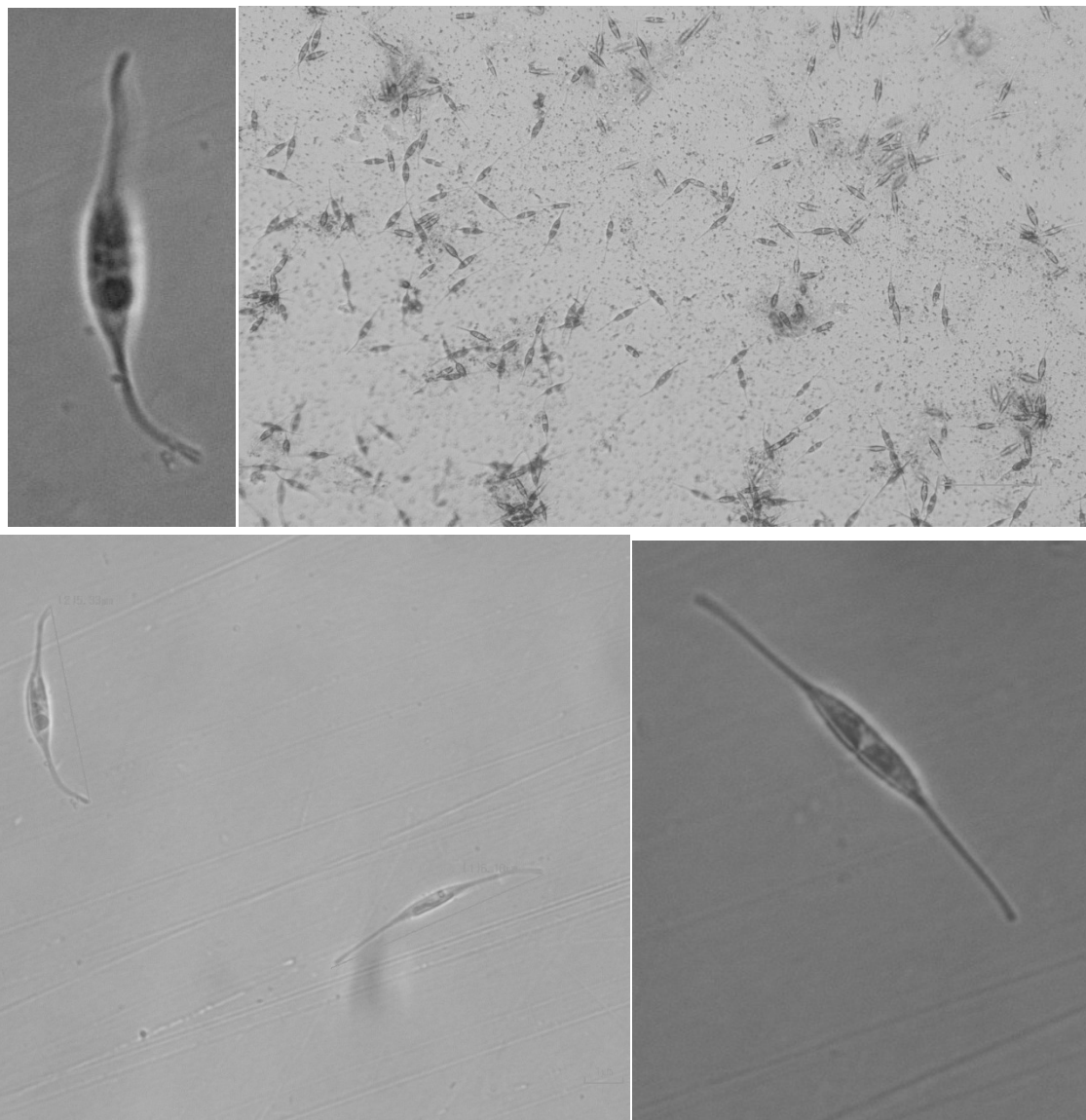
این گونه در محیط کشت F2s به خوبی کشت داده شد و به روش سانتریفوژ و سپس رقیق سازی خالص

گردید با وجود کشت در محیط های مختلف ذکر شده در قسمت روش ها، به کشت انبوه نرسید و نهایتاً تا

۱۰۰ سی سی حجم آن رسید. بنا بر این آنالیزهای پتانسیل غذایی برای این گونه انجام نشد، ولی شناسایی مولکولی گونه انجام شد.

بررسی توالی ژنی گونه، شناسایی مورفولوژی را تکمیل کرد. و مشخص گردید که این گونه با اینکه شباهت زیادی از نظر ریخت شناسی به گونه *Nitzschia longissima* دارد ولی بررسی توالی ژنی آن، گونه را *Cylidrotheca closterium* تعیین کرد، بنا بر این استرین ایرانی به نام سیلندرو تکا تعیین گردید. گونه خالص شده استرین آن به نام CHPC1 نامگذاری گردید که با همین نام در بانک ژنی ثبت شد. در جدول ۵ لسیته تمام گونه های شبیه استرین ایرانی را که در آنالیزهای مولکولی مورد استفاده بوده را نشان می دهد.

نتایج آنالیزهای مولکولی به دو روش NJ و MI انجام گرفت و آنالیز به روش MP با ۱۰۰۰ boot strap به دلیل زمان زیادی که صرف آنالیز (بیش از ۴ ساعت) شد متوقف گردید سپس با ۱۰۰ boot strap انجام شد. نتایج هر دو آنالیز انجام شده با حمایت ۱۰۰ و ۹۷ نشان داد که نزدیکترین گونه به استرین ایرانی *Cylidrotheca closterium* است (شکل های ۲۹-۳۰).

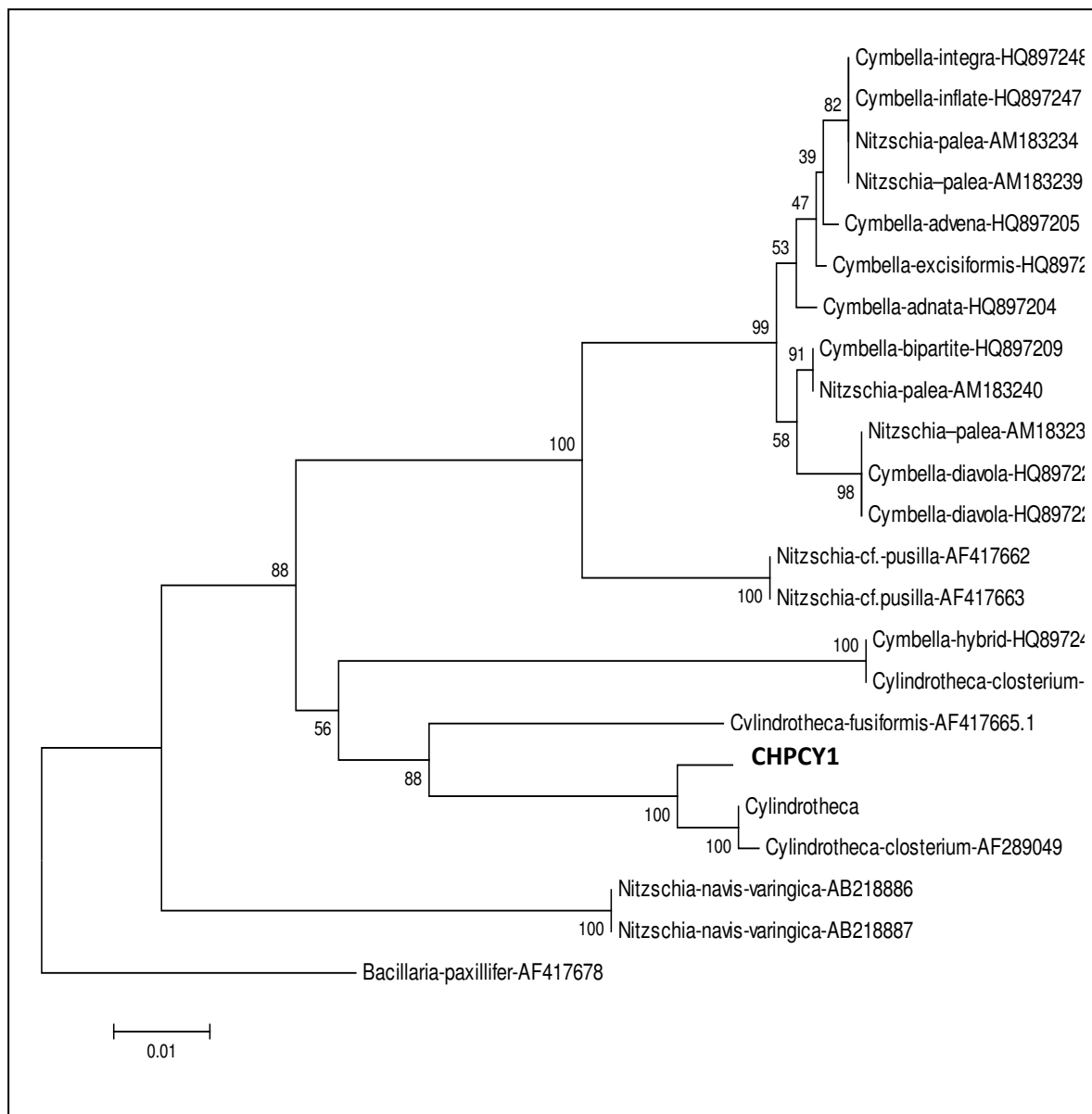


شکل ۲۸: گونه *Cylidrotheca closterium* جدا شده و خالص شده از سواحل سیستان و بلوچستان

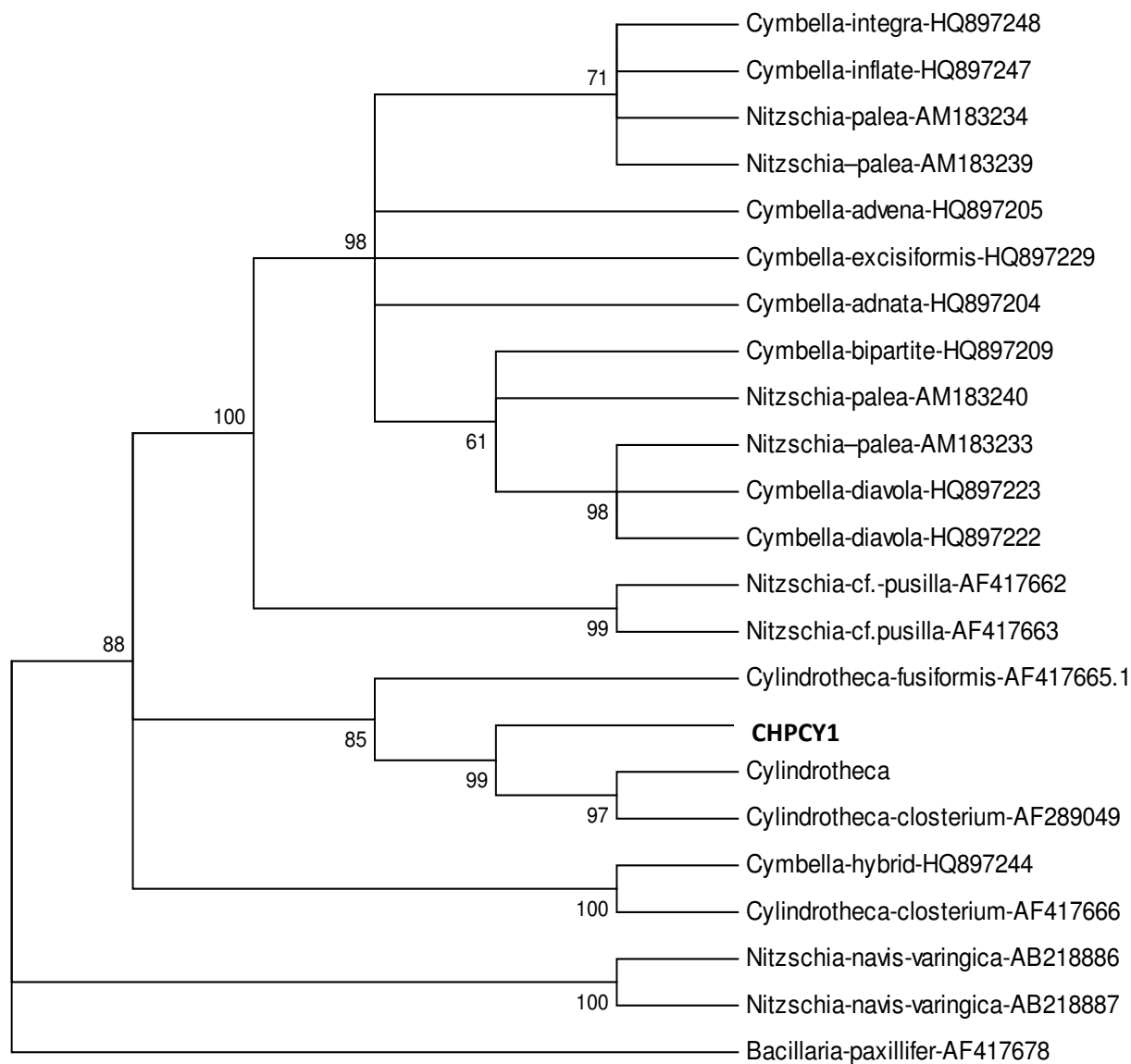
جدول ۵: اسامی گونه هایی مورد استفاده در آنالیز مولکولی همراه با شماره های ثبت ژنی آنها

اسامی گونه ها	GenBank Ac.no
<i>Cylindrotheca closterium</i>	مطالعه حاضر
<i>Cylindrotheca closterium</i>	AF289049
<i>Cylindrotheca closterium</i>	EU340870
<i>Cylindrotheca fusiformis</i>	AF417665
<i>Cymbella hybrid</i>	HQ897244
<i>Cylindrotheca closterium</i>	AF417666
<i>Cymbella diavola</i>	HQ897223
<i>Cymbella diavola</i>	HQ897222
<i>Nitzschia palea</i>	AM183233
<i>Cymbella integra</i>	HQ897248
<i>Cymbella inflate</i>	HQ897247
<i>Cymbella bipartite</i>	HQ897209
<i>Nitzschia cf.pusilla</i>	AF417663
<i>Nitzschia palea</i>	AM183240
<i>Nitzschia palea</i>	AM183239
<i>Nitzschia palea</i>	AM183234
<i>Nitzschia cf.pusilla</i>	AF417662
<i>Cymbella excisiformis</i>	HQ897229
<i>Cymbella adnata</i>	HQ897204
<i>Nitzschia navis varingica</i>	AB218887
<i>Nitzschia navis varingica</i>	AB218886
<i>Cymbella advena</i>	HQ897205
<i>Bacillaria paxillifer</i>	AF417678
<i>Cymbella excisiformis</i>	HQ897229

CHPCY1



شکل ۲۹: درخت فیلوژنی گونه *Cylindrotheca closterium* خالص شده از سواحل چابهار براساس توالی ژنی در قسمتی از ناحیه LSU با استفاده از آنالیز Maximum Likelihood (ML) مدل Jukes cantor الگوی ml Heuristics اعداد bootstrap را بر اساس 10۰۰ replication نشان می دهند. *Bacillaria paxillifer* عنوان outgroup انتخاب گردید.



شکل ۳۰: درخت فیلوژنی استرین CHPCY1 براساس توالی ژنی در قسمتی از ناحیه LSU با استفاده از آنالیز مدل NJ و الگوی بین نسلها به صورت homogenous انتخاب گردید. اعداد bootstrap را بر اساس replication 1۰۰۰ نشان می دهند. *Bacillaria paxillifer* عنوان outgroup انتخاب گردید.

5- *Nitzschia* sp.

این گونه به حجم بالا نرسید و پتانسیل غذایی آن انجام نشد

الف) آنالیزهای مورفولوژی و مولکولی

طبقه بندی گونه به شرح زیر است:

Phylum **Ochrophyta** (Cavalier-Smith, 1986) T. Cavalier-Smith, 1995

Class **Bacillariophyceae** Haeckel, 1878 – raphid. Pennate diatoms

Order **Bacillariales** Hendey, 1937

Family **Bacillariaceae** Ehrenberg, 1831

Genus *Nitzschia* Hassall, 1845, nom. Cons.

نام استرین: CHPN1

شماره ثبت در بانک ژن:

سایز گونه: ۶۲-۵۸ میکرومتر طول

رنگ: قهوه ای

این گونه خالص سازی شده شباهت زیادی به گونه های *N. laevis* دارد.

شکل ۳۱ مورفولوژی کلی گونه را نشان می دهد. آنالیزهای مولکولی مشخص کرد که در کلاد *N. navis*

varingica قرار می گیرد. این استرین در اوایل شروع کار عملی پروژه خالص سازی شده بود و بعد از

استخراج DNA و PCR نمونه به دلیل شرایط نامساعد قطع و وصل مکرر برق بعد از ۶ ماه نگهداری در

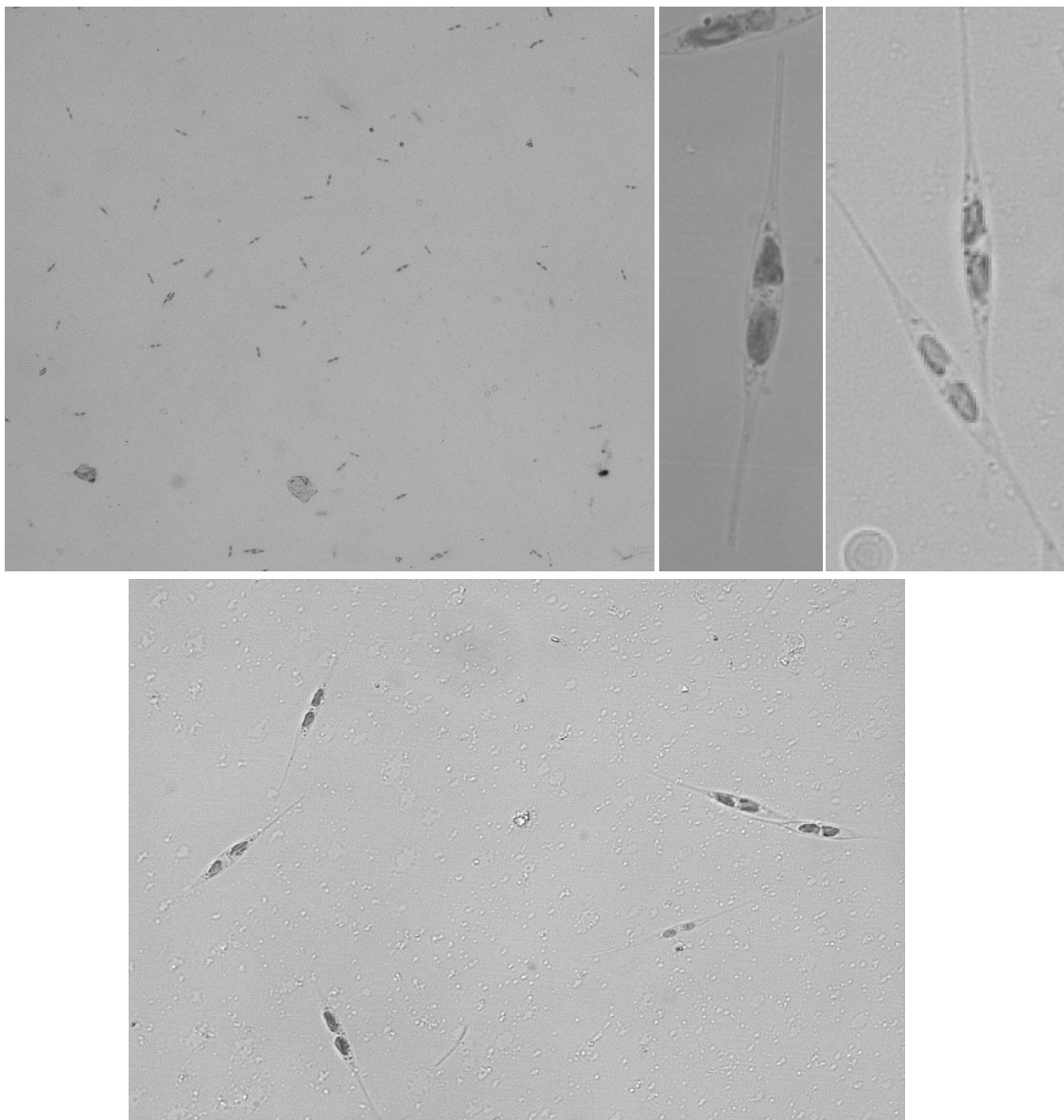
فایکولب از بین رفت.

لازم به ذکر است که این گونه اسید دومیک تولید کرده و مانند *Pseudo-nitzschia* از گونه های مضر

می باشد. بنا براین به منظور نگهداری در بانک فیتو پلانکتون و شناسایی دقیق گونه های بومی جدا سازی و

خالص گردید. توالی ژنی گونه با تمام گونه های موجود در بانک ژن که توالی مشابه دارند مقایسه گردید.

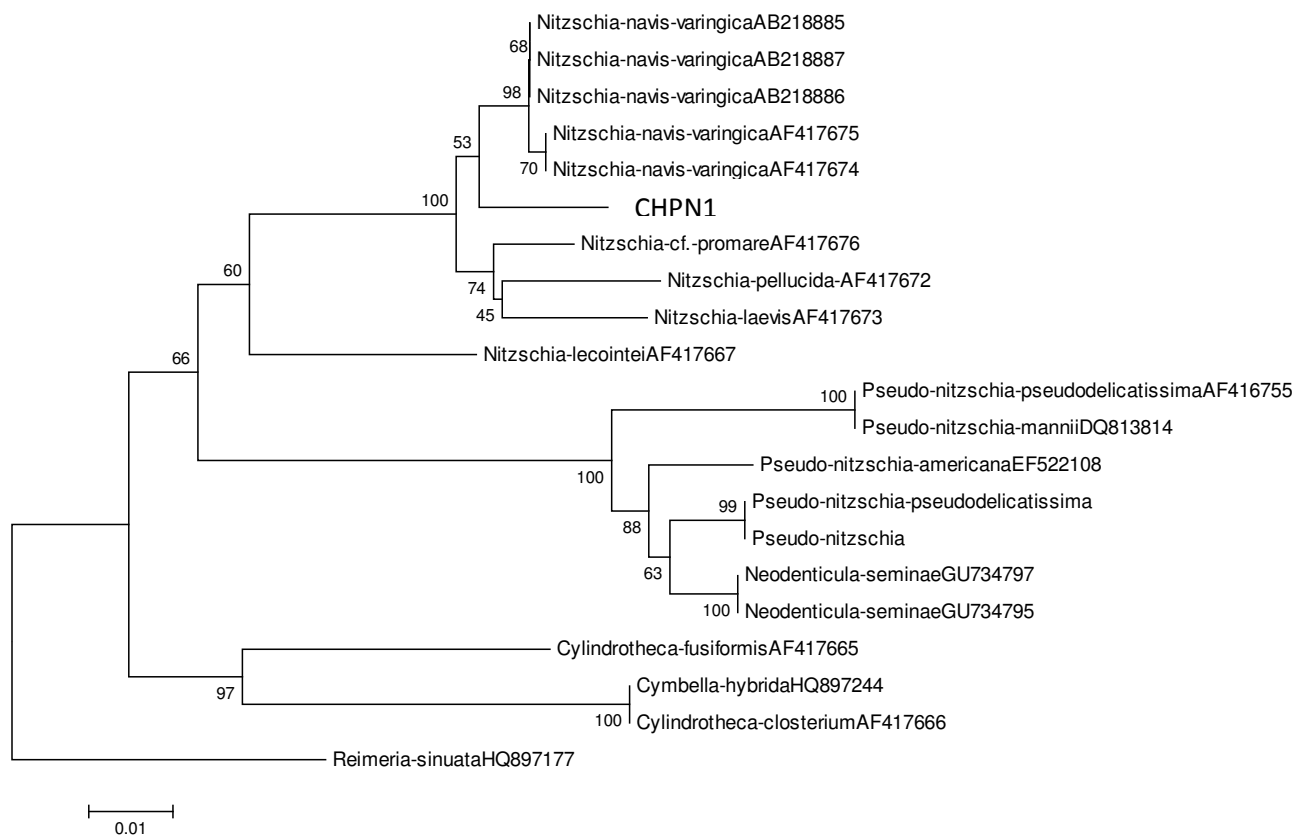
اسامی گونه هایی که در آنالیزهای مولکولی این گونه استفاده شده است در جدول ۶ آورده شده است.



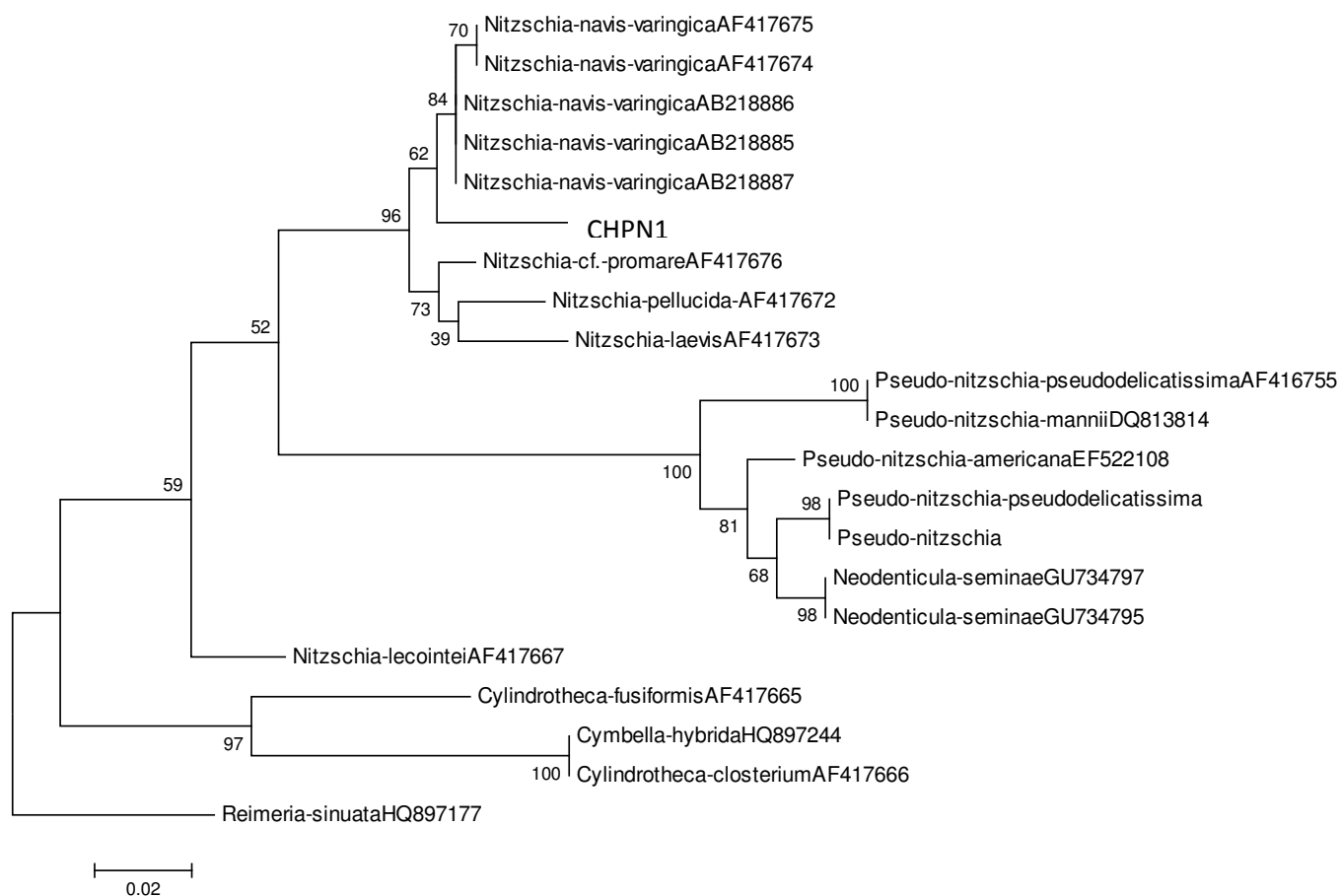
شکل ۳۱: گونه *Nitzschia* جدا شده و خالص شده از سواحل چابهار

جدول ۶: اسامی گونه های مورد استفاده در آنالیز مولکولی و شماره ثبت آنها در بانک ژنی

اسامی گونه ها	GenBank Acc. no
<i>Nitzschia sp.</i>	CHPN1
<i>Nitzschia navis-varingica</i>	AB218885
<i>Nitzschia navis-varingica</i>	AB218886
<i>Nitzschia navis-varingica</i>	AB218887
<i>Nitzschia navis-varingica</i>	AF417675
<i>Nitzschia navis-varingica</i>	AF417674
<i>Nitzschia laevis</i>	AF417673
<i>Nitzschia cf. promare</i>	AF417676
<i>Nitzschia pellucida</i>	AF417672
<i>Nitzschia lecointei</i>	AF417667
<i>Cymbella hybrid</i>	HQ897244
<i>Cylindrotheca closterium</i>	AF417666
<i>Cylindrotheca fusiformis</i>	AF417665
<i>Pseudo-nitzschia mannii</i>	DQ813814
<i>Pseudo-nitzschia pseudodelicatissim</i>	AF416755
<i>Reimeria sinuate</i>	HQ897771
<i>Pseudo-nitzschia pseudodelicatissima</i>	AF416756
<i>Neodenticula seminae</i>	GU734797
<i>Neodenticula seminae</i>	Gu734796
<i>Pseudo-nitzschia Americana</i>	EF522108



شکل ۳۲: درخت فیلوژنی استرین CHPN1 جدا و خالص شده از سواحل جنوب شرق ایران براساس توالی ژنی در قسمتی از ناحیه LSU با استفاده از آنالیز NJ مدل p-distance الگوی بین نسلها به صورت homogenous انتخاب گردید. اعداد bootstrap را بر اساس ۱۰۰۰ replication نشان می دهند. *Reimeria sinuata* به عنوان out group انتخاب گردید.



شکل ۳۳: درخت فیلوژنی گونه *Nitzschia cf. navis* خالص شده از سواحل چابهار براساس توالی ژنی در قسمتی از ناحیه LSU با استفاده از آنالیز Maximum Likelihood (ML) مدل Tamura Nei model روش NNJ. اعداد bootstrap را براساس 1000 replication نشان می دهند. *Reimeria sinuata* به عنوان out group انتخاب گردید.

6- *Cheatoceros cf. lorenzianus*

گونه به حجم بالا نرسید و پتانسیل غذایی آن ناموفق ماند
الف) شناسایی ریخت شناسی و مولکولی گونه
طبقه بندی گونه خالص شده از سواحل چابهار به شرح زیر است:

Phylum *Ochrophyta* (Cavalier-Smith, 1986) Cavalier-Smith, 1995
Subphylum *Diatomeae* (Dumortier, 1821) Cavalier-Smith, 1995 - diatoms
Class *Coscinodiscophyceae* Round & Crawford,
Order *Chaetocerotales*. Round & Crawford,
Family *Chaetocerotaceae* Ralfs,
Genus *Chaetoceros* Ehrenberg, 1844
Chaetoceros lorenzianus Grunow, 1863

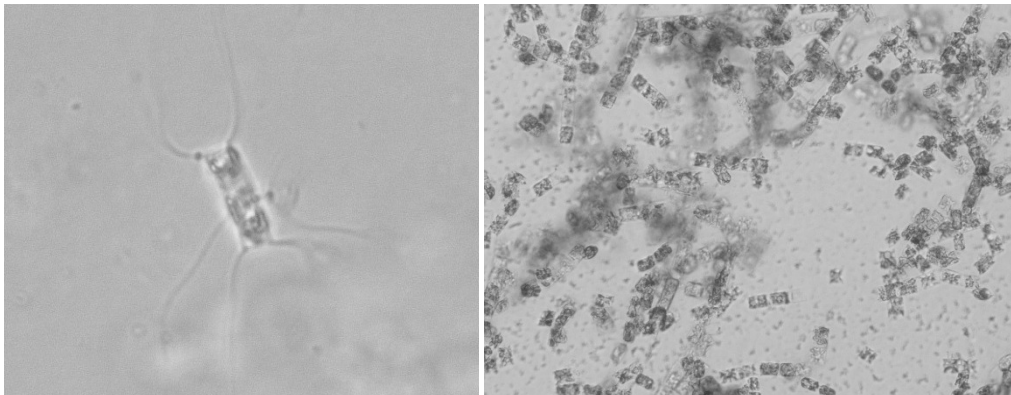
نام استرین : CHPCT1

شماره ثبت در بانک ژن :

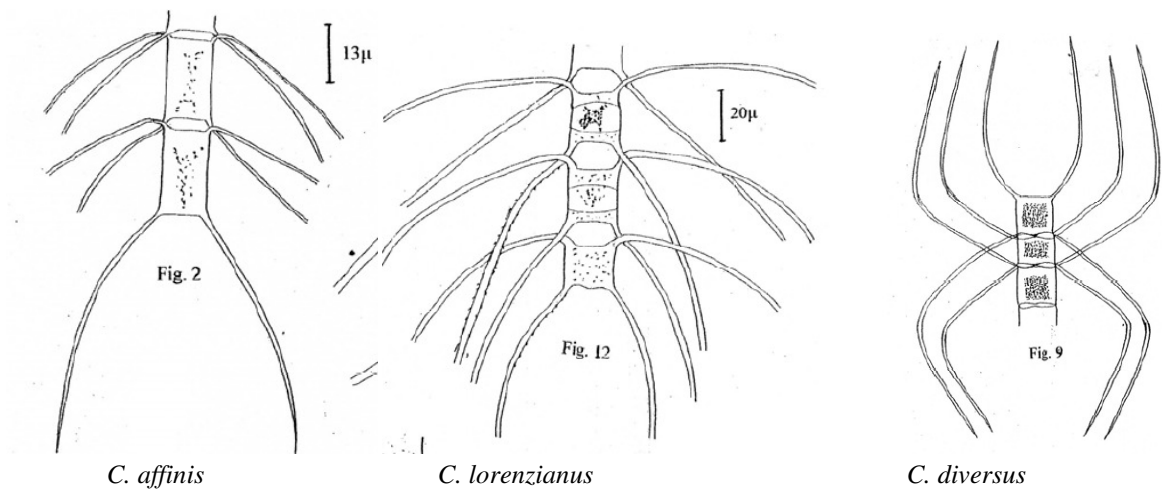
سایز گونه: ۱۲/۲۴ – ۱۰/۲ میکرومتر

رنگ گونه: طلایی - قهوه ای می باشد

گونه خالص سازی شده به صورت زنجیری کوتاه مشاهده گردید و اندازه آن ۱۱/۲۴ میکرومتر می باشد. سیتای (Setae) انتهایی در این گونه موازی محور اصلی است (شکل ۳۴) سیتای اینترکالری به صورت خمیده می باشد. این گونه از نظر ریخت شناسی شبیه به گونه های *C. diversus* و *C. affinis* می باشد (شکل های ۳۴ الف و ب) و فقط با تکیه بر شناسایی مورفولوژی ممکن است با گونه های ذکر شده به راحتی اشتباه تشخیص داده شود ولی بررسی توالی ژنی گونه ایرانی نشان داد که گونه ایرانی گونه کیتوسروس لورنزیانوس می باشد (شکل ۳۵-۳۶). گونه با استفاده از روش کشت رقیق سازی خالص گردید و در محیط کشت F2 کشت داده شد.



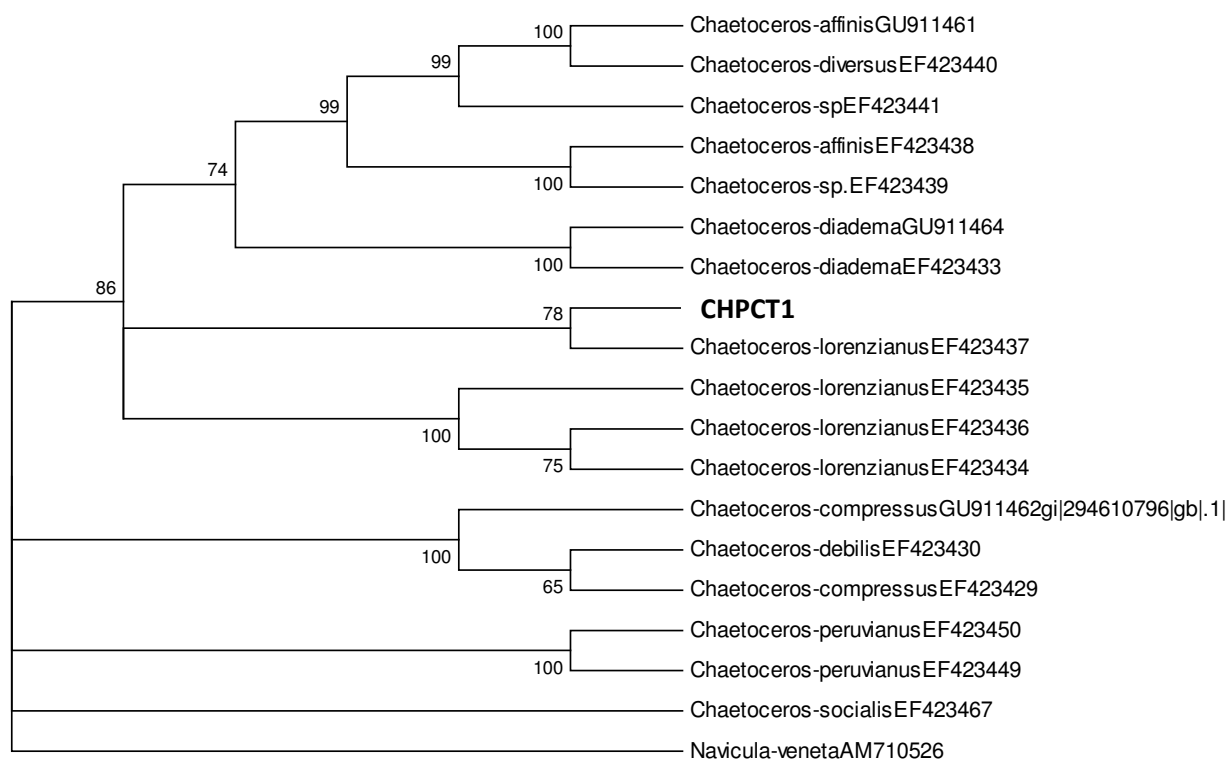
شکل ۳۴ الف: *Cheatoceros cf. lorenzianus* جدا شده و خالص شده از سواحل سیستان و بلوچستان



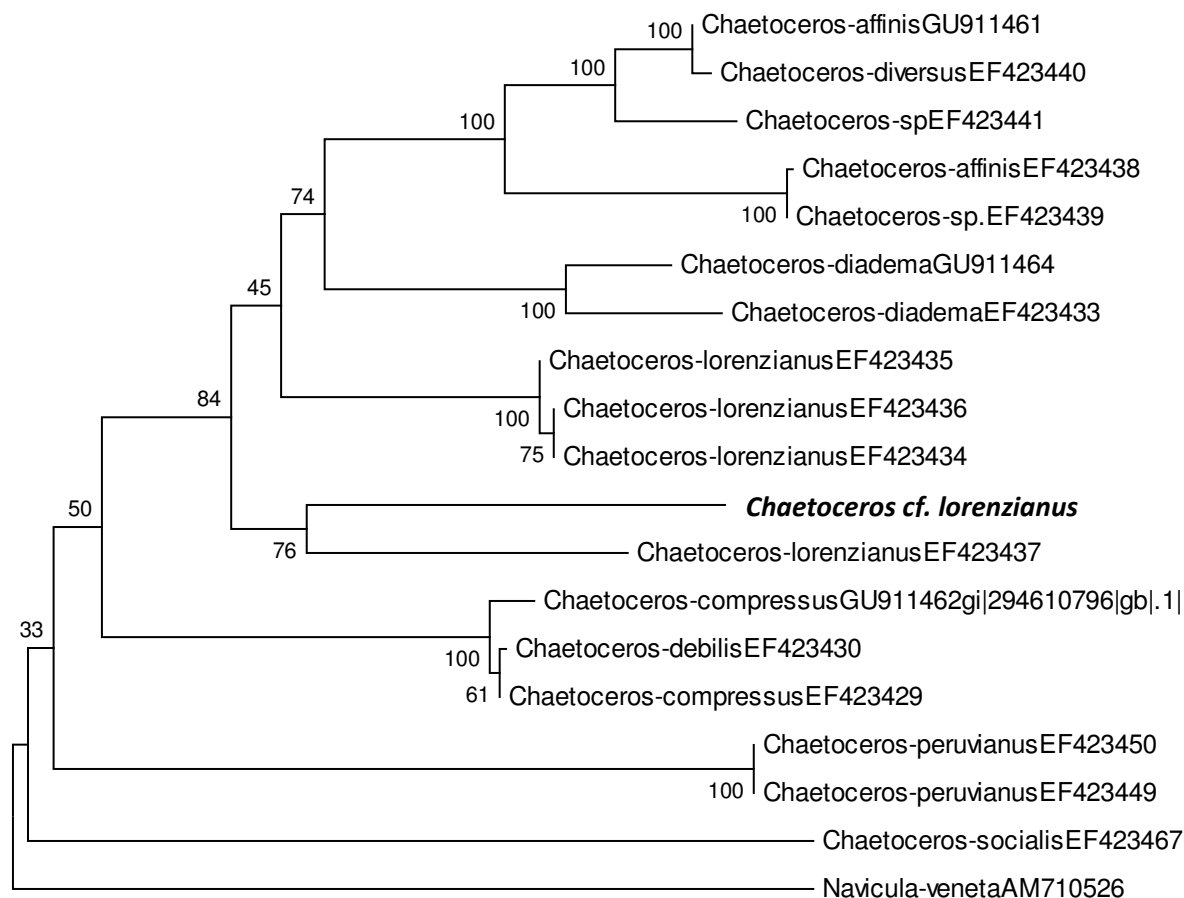
شکل ۳۴ ب: شکل شماتیک انواع گونه های کیتوسروس شبیه به گونه ایرانی اقتباس از
(Tabassum and Saifullah, 2010)

جدول ۷: اسامی گونه های مورد استفاده در آنالیز مولکولی و شماره ثبت آنها در بانک ژنی

اسامی گونه ها	Genbank Acc.no.
<i>Cheatoceros cf. lorenzianus</i>	CHPCT1
<i>Chaetoceros lorenzianus</i>	EF423435
<i>Chaetoceros lorenzianus</i>	EF423436
<i>Chaetoceros lorenzianus</i>	EF423434
<i>Chaetoceros affinis</i>	GU911461
<i>Chaetoceros diversus</i>	EF423440
<i>Chaetoceros diadema</i>	GU911464
<i>Chaetoceros diadema</i>	EF423433
<i>Chaetoceros sp.</i>	EF423441
<i>Chaetoceros compressus</i>	EF423429
<i>Chaetoceros lorenzianus</i>	EF423437
<i>Chaetoceros compressus</i>	GU911462
<i>Chaetoceros debilis</i>	EF423430
<i>Hemiaulus hauckii</i>	EF423428
<i>Chaetoceros affinis</i>	EF423438
<i>Chaetoceros sp.</i>	EF423439
<i>Chaetoceros peruvianus</i>	EF423450
<i>Chaetoceros peruvianus</i>	EF423449
<i>Bacteriastrum hyalinum</i>	EF423443
<i>Bacteriastrum hyalinum</i>	EF423442
<i>Chaetoceros socialis</i>	EF423467
<i>Navicula veneta</i>	AM710526



شکل ۳۵: درخت فیلوژنی گونه *Chaetoceros cf. lorenzianus* خالص شده از سواحل چابهار براساس توالی ژنی در قسمتی از ناحیه LSU با استفاده از آنالیز Maximum Likelihood (ML) مدل Tamura Nei model روش NNJ اعداد bootstrap را بر اساس 10۰۰ replication نشان می دهند. *Navicula veneta* به عنوان out group انتخاب گردید.



0.02

شکل ۳۶: درخت فیلوژنی *Chaetoceros cf. lorenzianus* استرین CHPC1 جدا شده از سواحل جنوب شرق ایران براساس توالی ژنی در قسمتی از ناحیه LSU با استفاده از آنالیز NJ مدل P distans و الگوی بین نسلها به صورت homogenous انتخاب گردید. اعداد bootstrap را براساس ۱۰۰۰ replication نشان می دهند. گونه *Navicula veneta* به عنوان outgroup انتخاب گردید.

گونه به حجم بالا رسید بنا بر این آنالیز پتانسیل آن انجام شد

الف) بررسی ریخت شناسی و مولکولی گونه

طبقه بندی گونه به شرح زیر است:

Phylum *Ochrophyta* (Cavalier-Smith, 1986) Cavalier-Smith, 1995
Subphylum *Diatomeae* (Dumortier, 1821) Cavalier-Smith, 1995 - diatoms
Class *Coscinodiscophyceae* Round & Crawford, in Round et al., 1990 -
Order *Chaetocerotales*. Round & Crawford, in Round et al., 1990
Family *Chaetocerotaceae* Ralfs, in Pritchard, 1861
Genus *Chaetoceros* Ehrenberg, 1844

نام استرین : CHPCT2

شماره ثبت در بانک ژن:

سایز گونه: ۷-۹.۵ میکرومتر طول

رنگ استرین: قهوه‌ای-طلایی

این گونه تفاوتی که به گونه قبلی کیتوسروس دارد اینکه به صورت رشته ای نیست و سلول های آن تشکیل

زنجر نمی دهند از نظر مورفولوژیکی شبیه به گونه های *C. calcitrans*، *C. gracilis* و *C. mulleri* است ولی

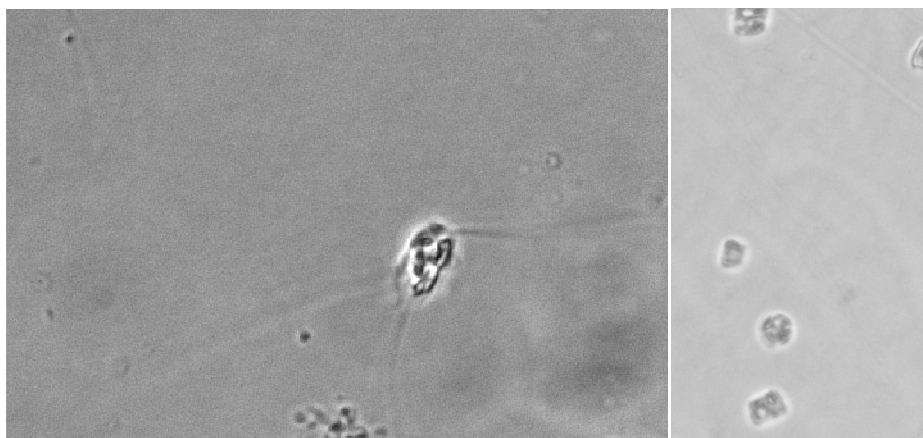
اطلاعات مولکولی گونه هم کمکی به شناسایی گونه های نکرد زیرا اطلاعات موجود در بانک ژنی برای

گونه های کیتوسروس تک رشته ای در نواحی مورد بررسی در این مطالعه وجود نداشت و کلیه اطلاعات

موجود در بانک ژن DNA استخراج شده از کلروپلاست بود که با این مطالعه مطابقت نداشت. برای شناسایی

دقیق گونه ای، دیگر نواحی ژنی تحت بررسی می باشد.

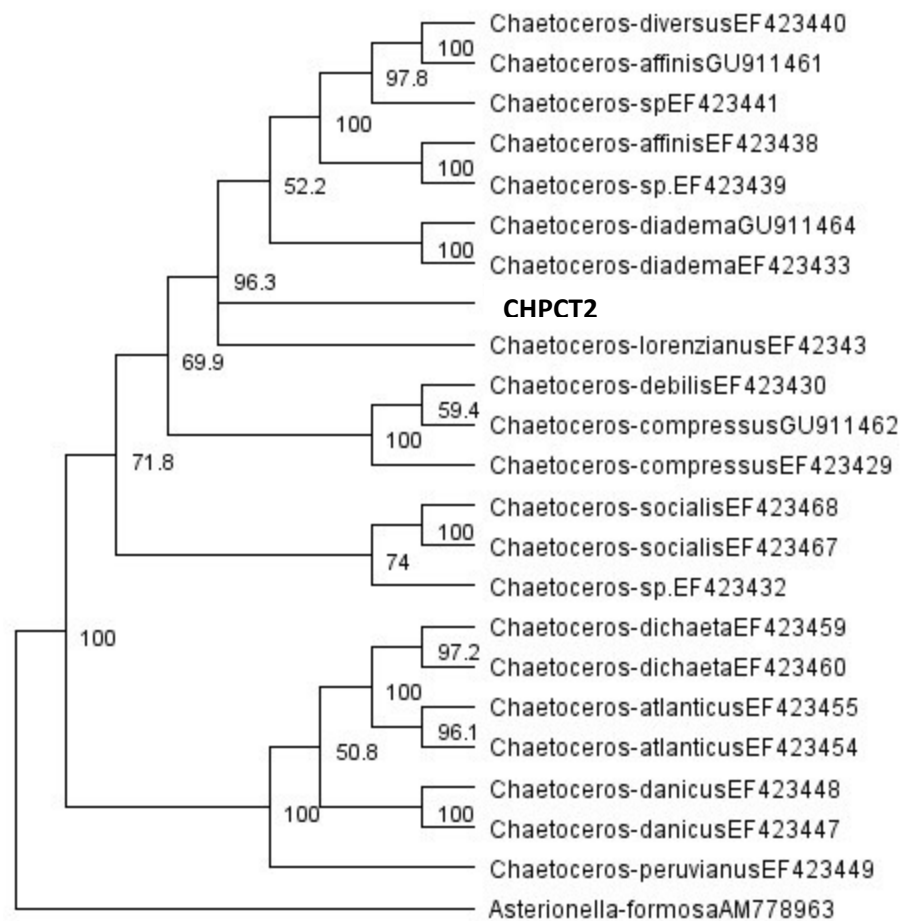
این گونه در ۶ ماه اول پروژه به حجم انبوه رسید و تا ۱۰ لیتر هم کشت داده شد و لی متأسفانه قبل از ارسال برای آنالیزهای بعدی گونه در آزمایشگاه در مدت تعطیلات نوروزی و عدم شرایط مناسب از بین رفت و مجدداً جداسازی و خالص گردید. به روش رقیق سازی جدا گردید و در محیط کشت F2 و کانوی به خوبی رشد یافت. رنگ گونه طلایی-قهوه ای و استرین آن به رنگ قهوه ای می باشد.



شکل ۳۷: گونه *C. sp.* جدا شده و خالص شده از سواحل چابهار

جدول ۸: اسامی گونه های مورد استفاده در آنالیز مولکولی و شماره ثبت آنها در بانک ژنی

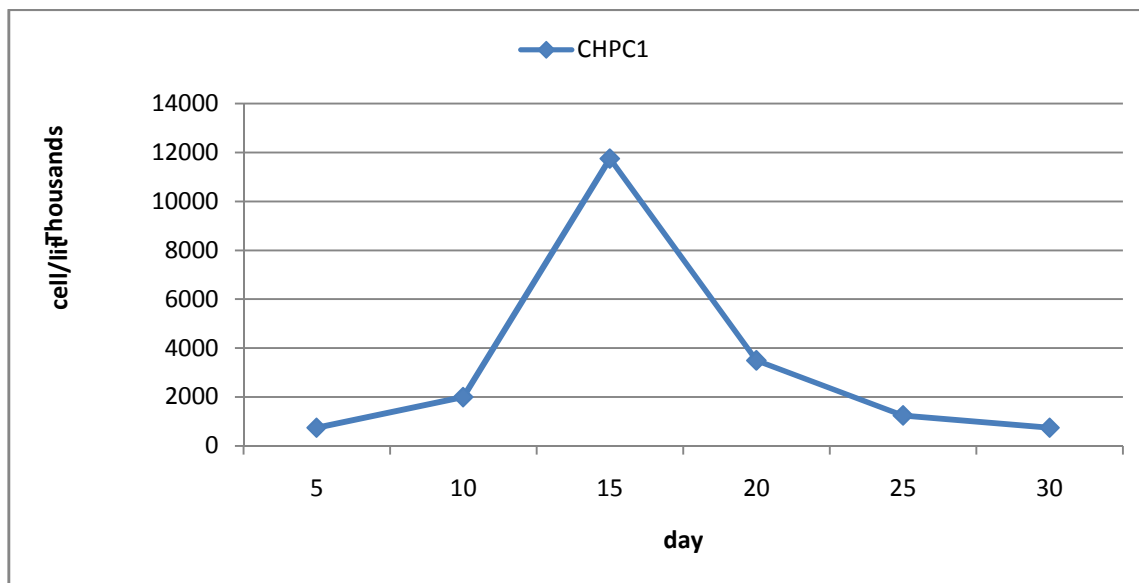
اسامی گونه ها	شماره ثبت در بانک ژنی
<i>Chaetoceros sp.</i>	CHPCT2
<i>Chaetoceros lorenzianus</i>	EF423435
<i>Chaetoceros lorenzianus</i>	EF423436
<i>Chaetoceros lorenzianus</i>	EF423434
<i>Chaetoceros affinis</i>	GU911461
<i>Chaetoceros diversus</i>	EF423440
<i>Chaetoceros diadema</i>	GU911464
<i>Chaetoceros diadema</i>	EF423433
<i>Chaetoceros sp</i>	EF423441
<i>Chaetoceros compressus</i>	EF423429
<i>Chaetoceros compressus</i>	GU911462
<i>Chaetoceros debilis</i>	EF423430
<i>Chaetoceros sp</i>	EF423432
<i>Chaetoceros affinis</i>	EF423438
<i>Chaetoceros sp.</i>	EF423439
<i>Chaetoceros peruvianus</i>	EF423450
<i>Chaetoceros peruvianus</i>	EF423449
<i>Chaetoceros dictyota</i>	EF423459
<i>Chaetoceros socialis</i>	EF423467
<i>Chaetoceros danicus</i>	EF423448
<i>Chaetoceros danicus</i>	EF423447
<i>Chaetoceros dictyota</i>	EF423460
<i>Chaetoceros socialis</i>	EF423468
<i>Chaetoceros atlanticus</i>	EF423455
<i>Chaetoceros atlanticus</i>	EF423454
<i>Asterionella-formosa</i>	AM778963



شکل ۳۸: درخت فیلوژنی *Chaetoceros sp* استرین CHPC2 جدا شده از سواحل جنوب شرق ایران براساس توالی ژنی در قسمتی از ناحیه LSU با استفاده از آنالیز NJ مدل P distans و الگوی بین نسلها به صورت homogenous انتخاب گردید. اعداد bootstrap را بر اساس ۱۰۰۰ replication نشان می دهند. گونه *Asterionella formosa* به عنوان outgroup انتخاب گردید.

ب) رشد نسبی

بررسی رشد نسبی سلول نشان داد که این گونه از رشد خوبی برخوردار است و تا روز ۱۵ تعداد سلولها در لیتر به ۱۲۰۰۰ می رسد که نشان دهنده این است که تقریبا در عرض دو هفته تعداد سلولها ۱۲ برابر می شوند و از روز ۱۵ به بعد تعداد سلولها کاهش می یابند (شکل ۳۹)



شکل ۳۹: رشد نسبی گونه *Cheateoceros* sp. جدا شده از سواحل چابهار

ج) پتانسیل غذایی

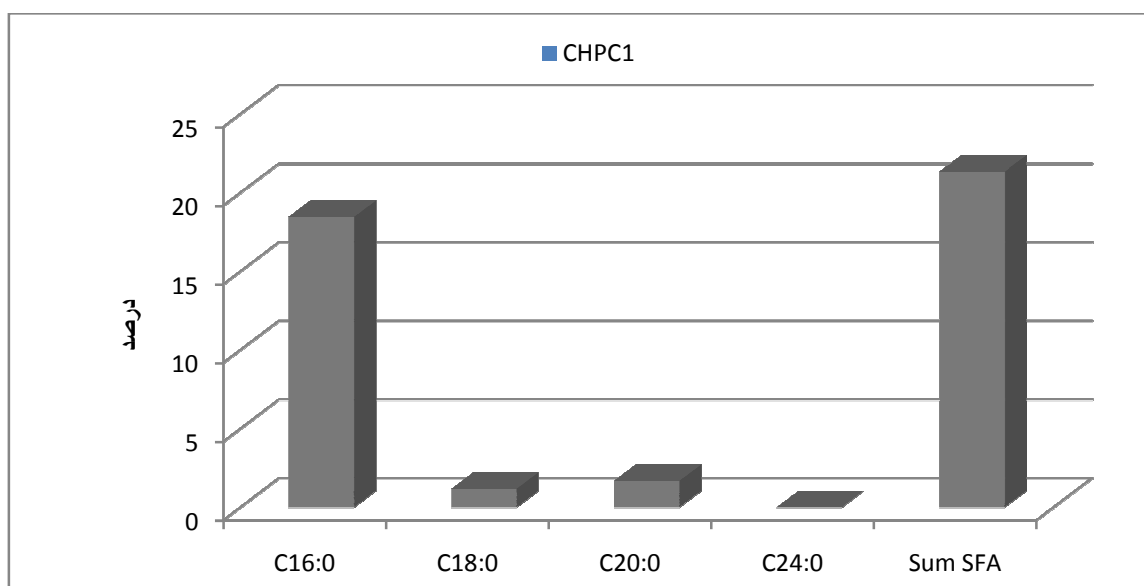
۱- اسیدهای چرب

از بین اسیدهای چرب اشباع شده بالاترین میزان متعلق به C16:0 و کمترین میزان آن مربوط به C24:0 می باشد (شکل ۴۰). اسیدهای چرب غی را اشباع با یک پیوند دو گانه ۴۰ درصد از کل اسیدهای چرب را تشکیل می

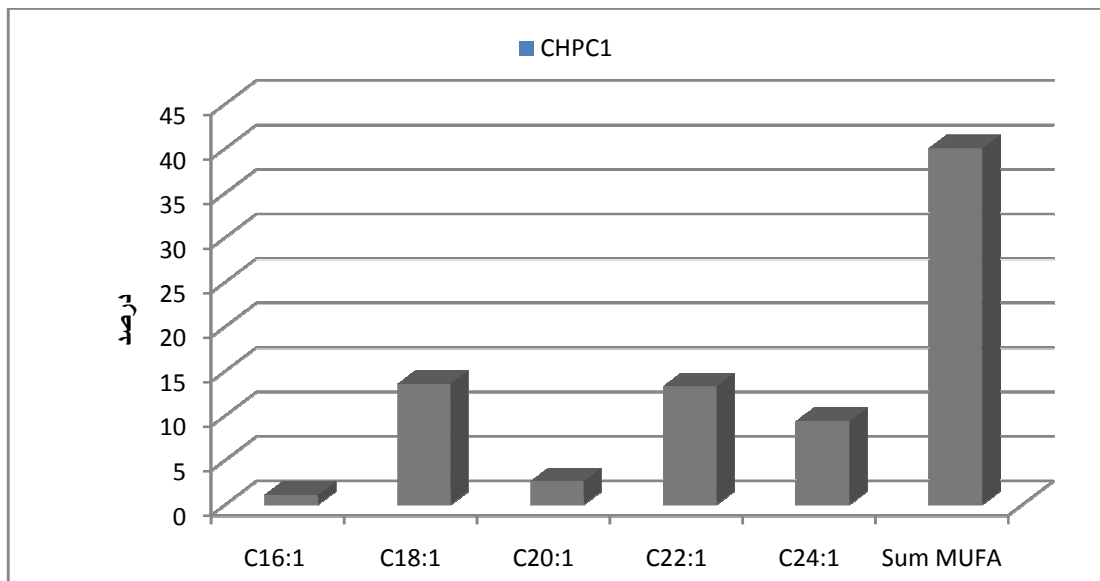
دهد که اسید چرب غالب در این گروه با میزان ۱۳/۵ درصد C18:1 می باشد شکل (۴۱). اسیدهای چرب غیر اشباع با چند پیوند دو گانه در این گونه ۱۶٪ از کل اسیدهای چرب را تشکیل می دهد و C18:2(n-6) با میزان ۹٪ بیشترین میزان را به خود اختصاص داد شکل (۴۲) مقایسه این سه گروه اسید چرب و پروفیل اسیدهای چرب گونه در شکلهای ۴۳-۴۴ آورده شده است

۲- کربوهیدرات، پروتئین و چربی کل

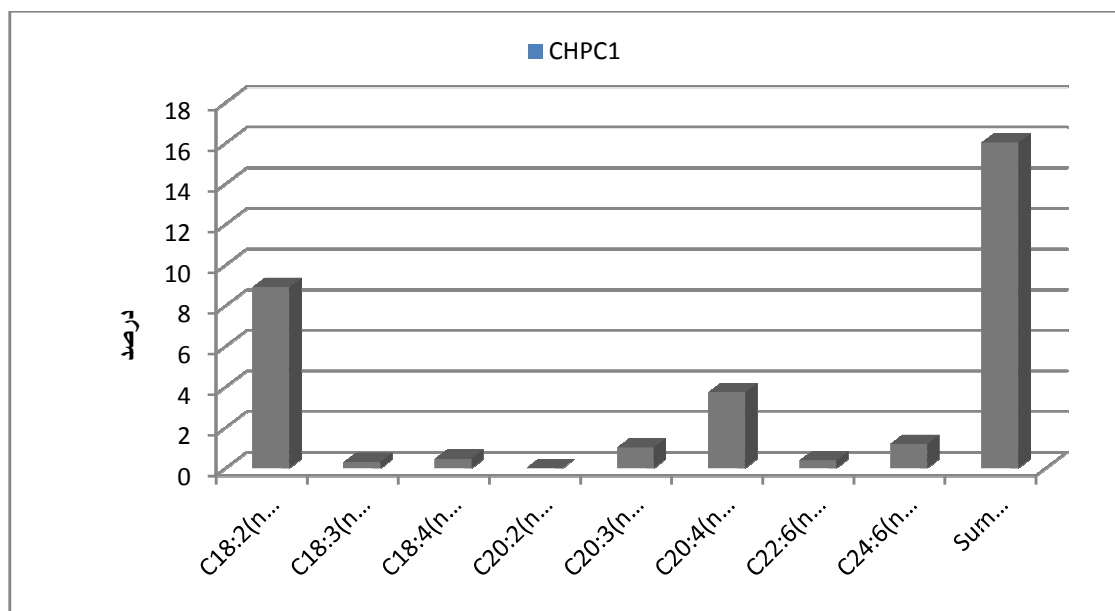
میزان پروتئین در این گونه ۳۲ درصد می باشد و کربوهیدرات ۱۱ درصد و چربی کل ۸ درصد از وزن خشک نمونه را تشکیل داد (شکل ۴۵).



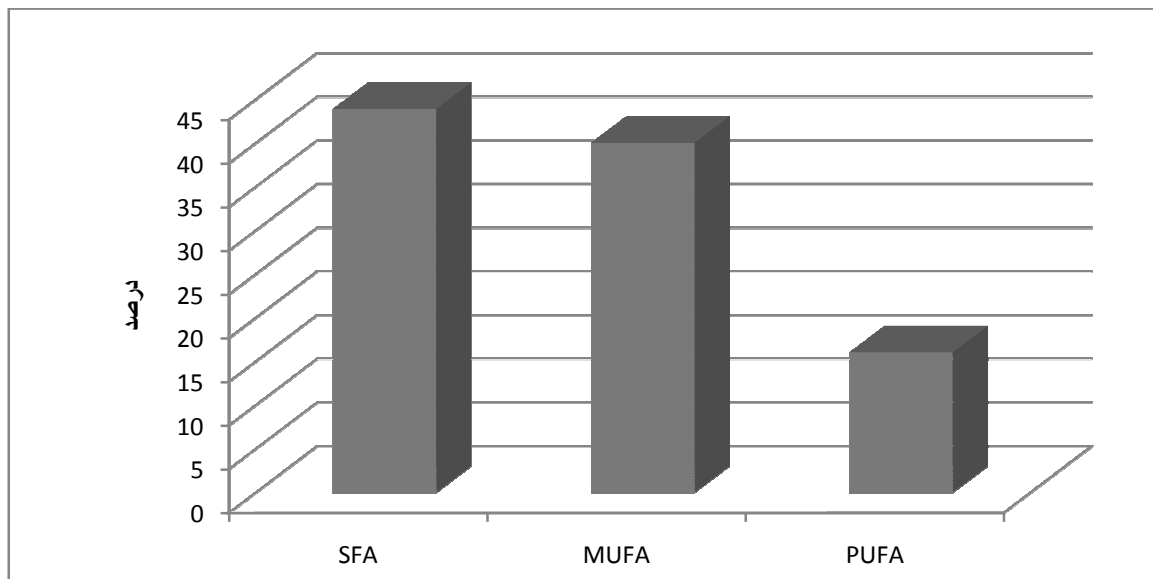
شکل ۴۰: مقایسه درصد انواع اسیدهای چرب اشباع شده در گونه *Cheatoceros* sp. جدا شده از سواحل چابهار



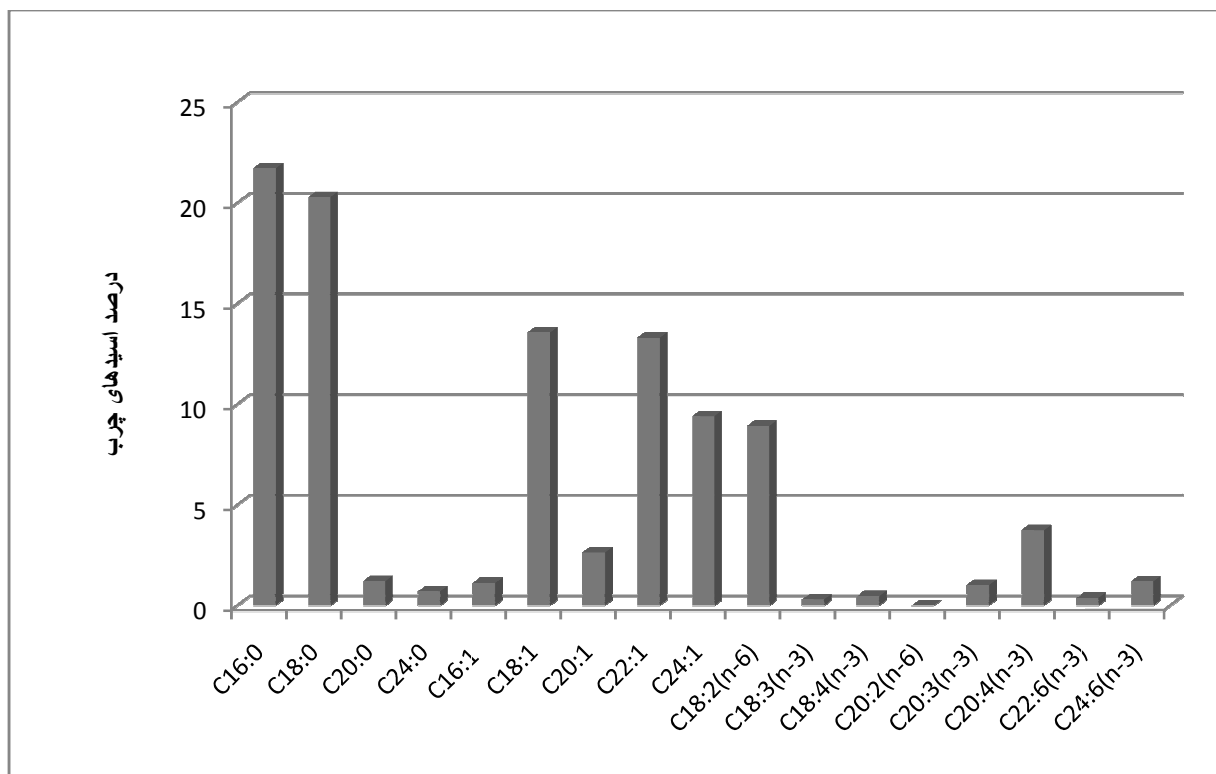
شکل ۴۱: مقایسه درصد انواع اسیدهای چرب اشباع شده با یک پیوند دو گانه در گونه *Cheatoceros* sp. جدا شده از سواحل چابهار



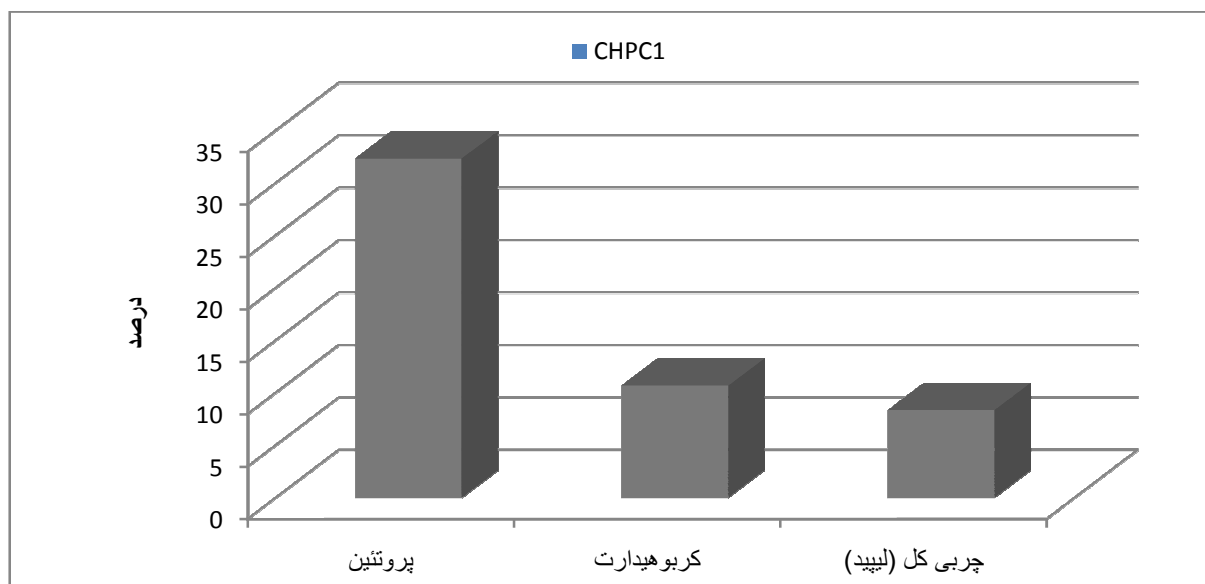
شکل ۴۲: مقایسه درصد انواع اسیدهای چرب اشباع شده با چند پیوند دو گانه در گونه *Cheatoceros* sp. جدا شده از سواحل چابهار



شکل ۴۳: مقایسه درصد کل اسیدهای جرب اشباع شده، اشباع نشده با یک پیوند دو گانه و اسیدهای جرب اشباع نشده با چند پیوند دو گانه در گونه *Cheatoceros sp.* جدا شده از سواحل چابهار



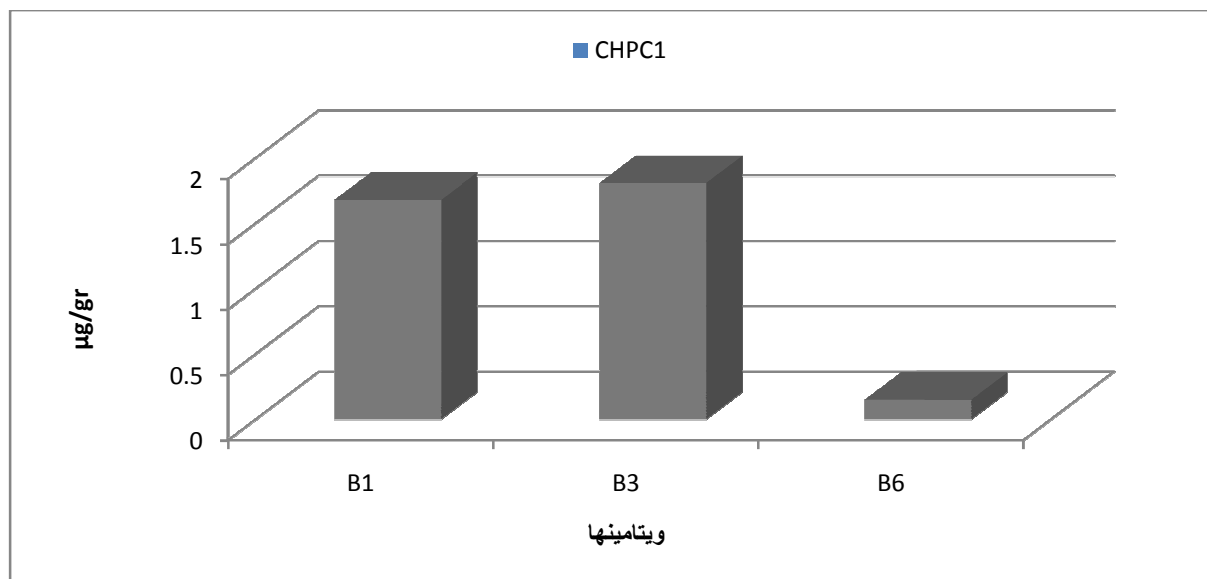
شکل ۴۴: پروفیل اسیدهای چرب در گونه *Cheatoceros* sp. جدا شده از سواحل چابهار



شکل ۴۵: مقایسه درصد پروتئین، کربوهیدرات و چربی کل در گونه *Cheatoceros* sp. جدا شده از سواحل چابهار

۳- ویتامینها

از میان ویتامینهای اندازه گیری شده بیشترین ویتامین بی ۳ بوده که به میزان ۱.۹ میکروگرم بر گرم دارای بالاترین مقدار بود (شکل ۴۶)



شکل ۴۶: مقایسه میزان برخی از ویتامینهای محلول در آب در گونه *Cheatoceros* sp. جدا شده از سواحل چابهار

8- *Isochrysis* sp

گونه به حجم بالا رسید بنا بر این اِپتانسیل غذایی آن مورد بررسی قرار گرفت.

الف) بررسی ریخت شناسی و مولکولی گونه

طبقه بندی گونه به شرح زیر است:

Phylum *Haptophyta* Hibberd ex Cavalier-Smith, 1986

Class *Prymnesiophyceae* Hibberd, 1976

Order *Isochrysidales* Pascher, 1910

Family *Isochrysidaceae*

Genus *Isochrysis* Parke, 1949

نام استرین: CHPIS1

اندازه گونه: ۳-۶ میکرومتر

رنگ استرین: قهوه ای

این گونه از گونه های قهوه ای است سلولهای آن گرد و سایز آن ۳-۶ میکرومتر است به روش رقیق ساری و

کشت روی अगर جدا سازی گردید در محیط F2 رشد خوبی دارد استرین آن به نام CHPIS1 نام گذاری

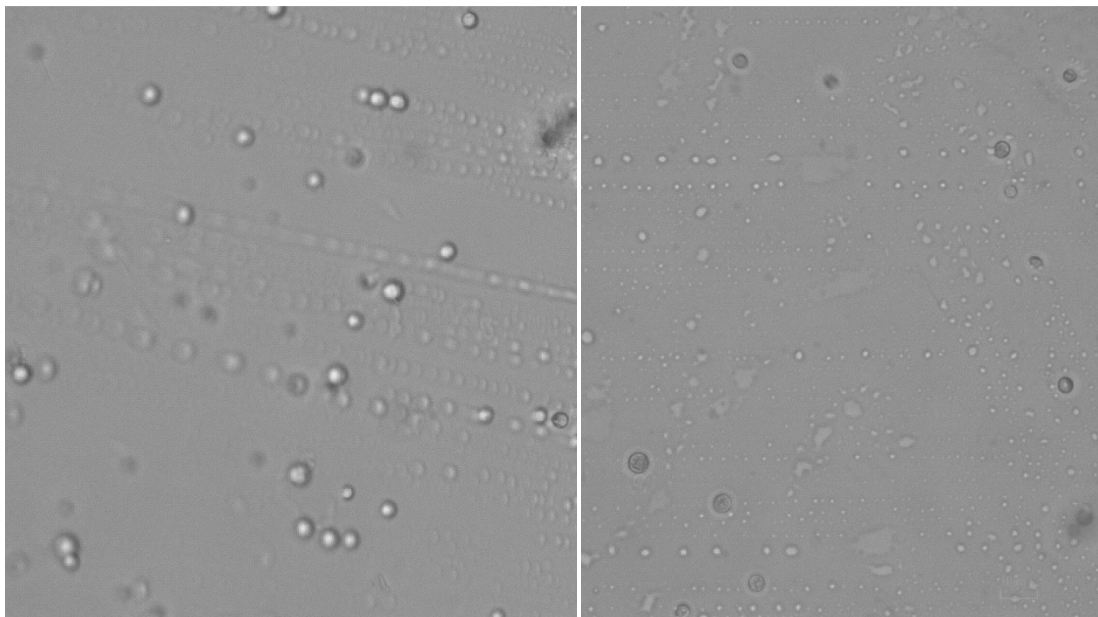
گردید. به دلیل سایز ریز گونه بررسی مورفولوژی با میکروسکوپ نوری اطلاعات زیادی را در اختیار قرار

نمی دهد (شکل ۴۷) استخراج گونه DNA فقط با روش فنل کلروفرم باند ضعیفی تشکیل دلد ولی با روش

CTAB و دیگر روشها جواب نداد PCR نمونه هم به دلیل مقدار کم DNA جواب نداد بنا بر این شناسایی

مولکولی گونه موفقیت امیز نبود. گونه در محیط کشت کانوی به کشت انبوه رسانده شد که به رنگ قهوه

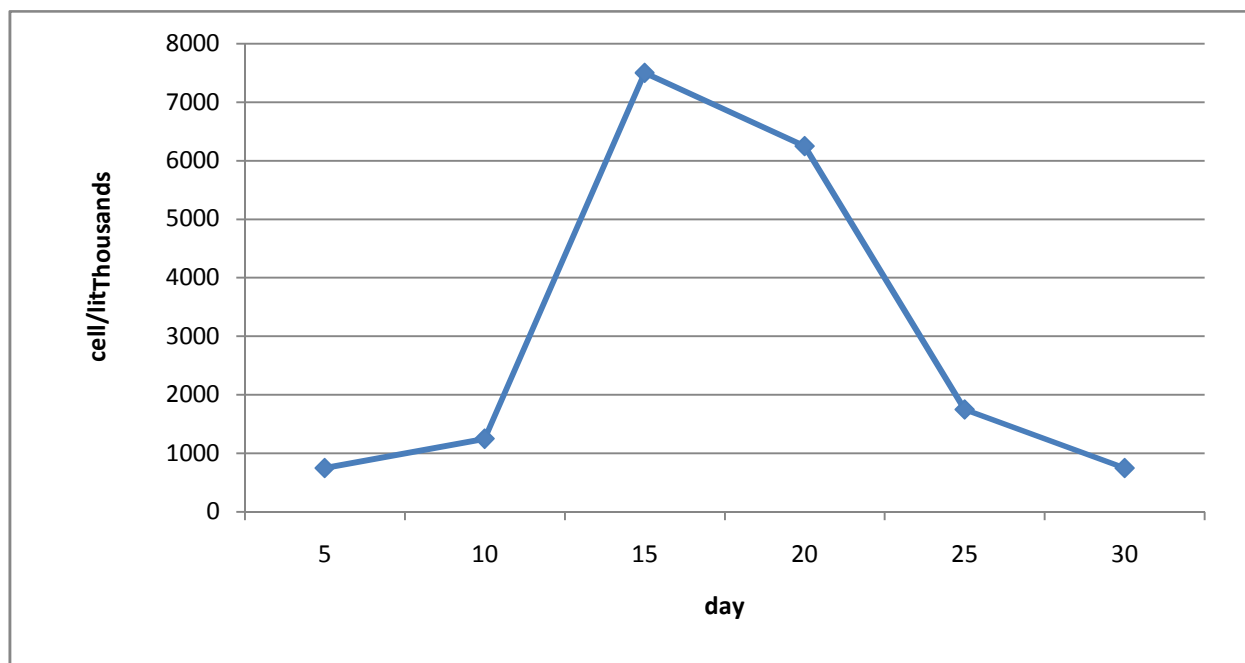
ای می باشد.



شکل ۴۷: گونه ایزوکرایسیس جدا شده از سواحل چابهار

ب) رشد نسبی

رشد نسبی گونه مناسب است و همانطور که نمودار ۳۹ نشان می دهد نمونه از روز ۱۰-۱۵ شروع به رشد لگاریتمی خود کرده و در روز ۱۵ به حداکثر تراکم خود طی ۳۰ روز رسیده و بعد از ۱۵ روز وارد فاز ثابت رشد شده و از روز ۲۰ به بعد تراکم آن کاهش می یابد و وارد فاز مرگ می شود. بنا بر این تعویض کشت نمونه می تواند هر ۱۵ روز یک بار صورت گیرد.



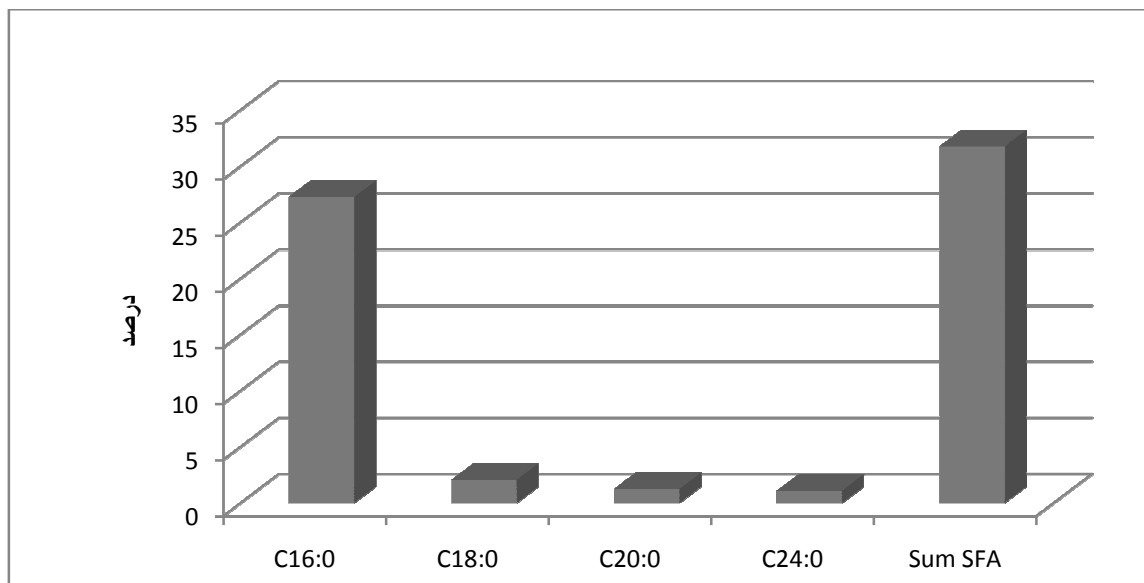
شکل ۴۸: رشد نسبی گونه ایزوکرایسیس *Isochrysis sp.* طی ۳۰ روز بررسی جدا شده از سواحل دریای عمان

(ج) بررسی ارزش غذایی

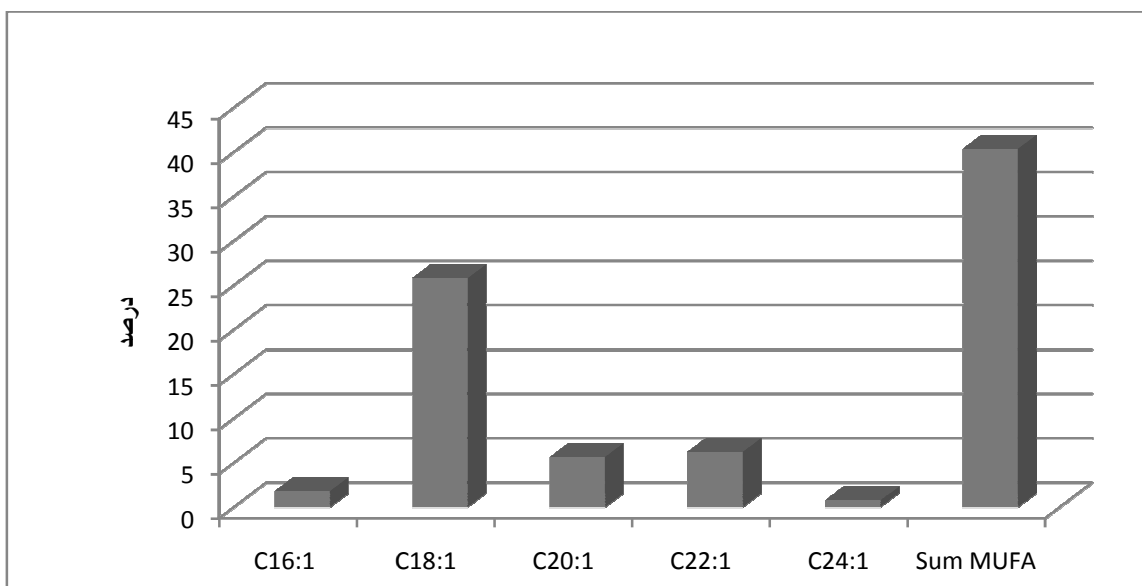
۱- اسید چرب

نتایج نشان داد که در گونه *Isochrysis sp.* میزان کل اسیدهای چرب ۱۹.۷۹ گرم درصد است. میزان امگا ۳ در این گونه ۰.۳۷ گرم درصد است و بیشترین مقدار ۰.۱۰۹ گرم درصد مربوط به اسید دوکوزاهگزانوئیک می باشد. اسیدهای چرب اشباع شده ۳۱.۷۸ درصد از کل اسیدهای چرب را تشکیل می دهد (شکل ۴۹). که بیشترین مقدار را پالمیتیک اسید با ۲۷.۳ درصد و کمترین مقدار (۱.۱ درصد) را ارشیدونیک اسید دارد. اسیدهای چرب غیر اشباع (MUFA) با یک پیوند دو گانه ۴۰.۳۹ درصد از مجموع اسیدهای چرب را تشکیل داده که بیشترین مقدار آن مربوط به اولئیک اسید با ۲۵.۸۲ درصد و کمترین مقدار مربوط به نروونیک اسید ۰.۸ درصد می باشد. اسیدهای چرب غیر اشباع با چند پیوند دو گانه ۲۷.۸ درصد از مجموع اسیدهای چرب را تشکیل می دهند که در بین آنها بیشترین مقدار را لینولئیک اسید با ۱۵.۳ درصد تشکیل داده و کمترین را

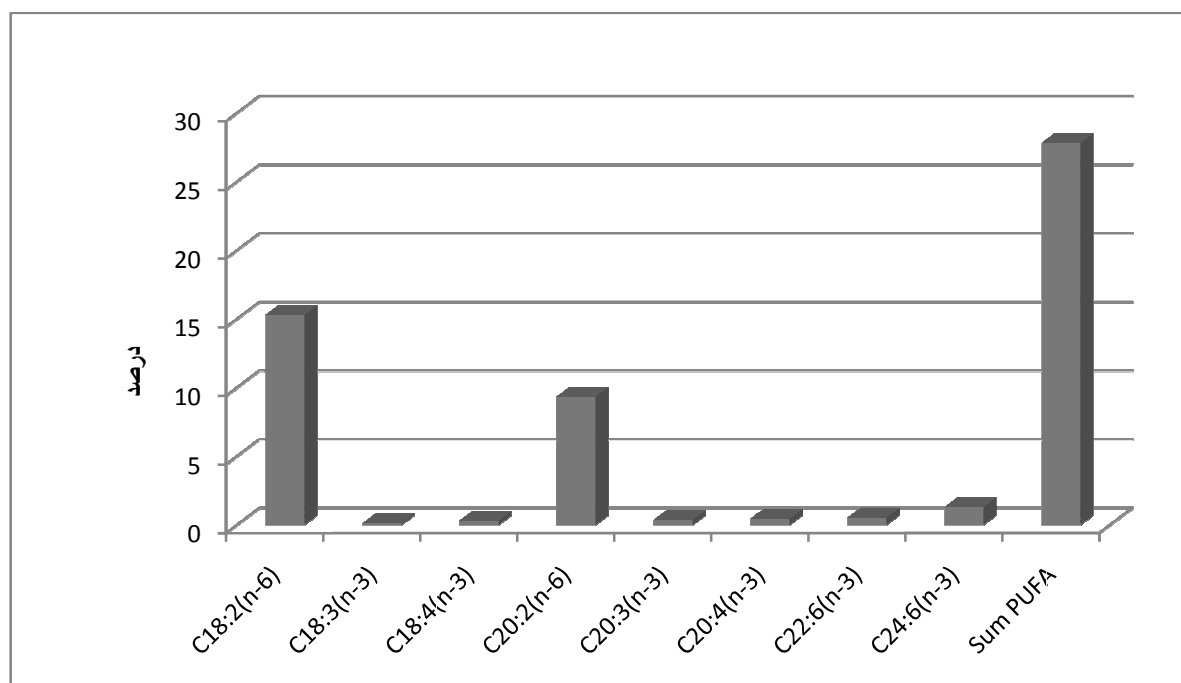
اسیدلینولنیک با مقدار ۰.۱۳ درصد تشکیل می دهد (نمودارهای ۵۰-۵۱). از میان انواع اسیدهای چرب انثازه گیری شده بیشترین درصد مربوط به اسیدهای پرب غیر اشباع می باشد (شکل ۵۲). پروفیل کل اسیدهای چرب در نمودار ۵۳ نشان داده شده است.



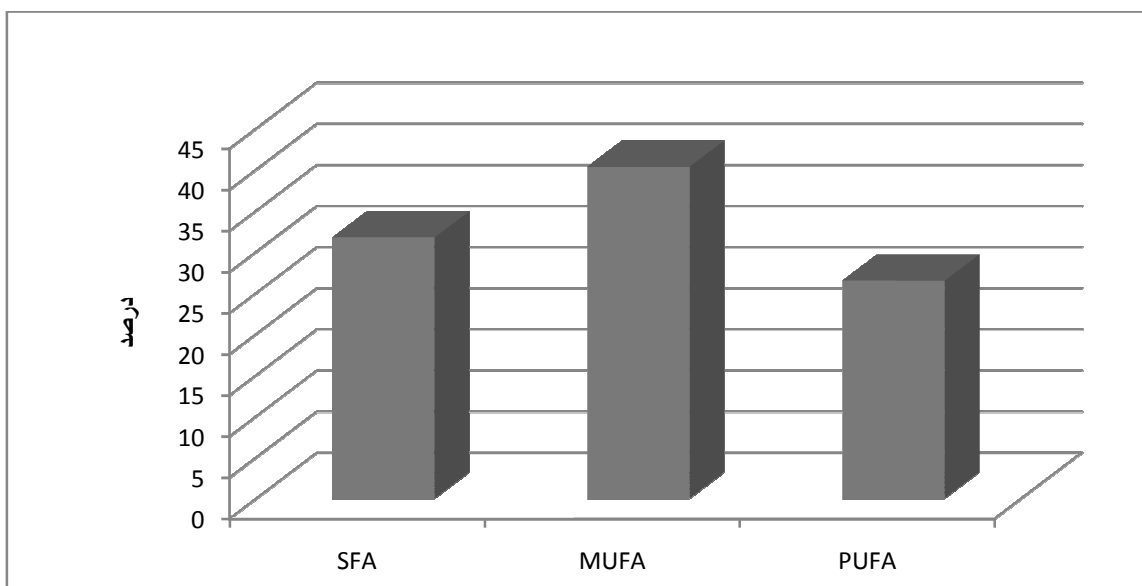
شکل ۴۹: درصد انواع اسیدهای چرب اشباع شده در گونه Isochrysis جدانشده از سواحل سیستان و بلوچستان



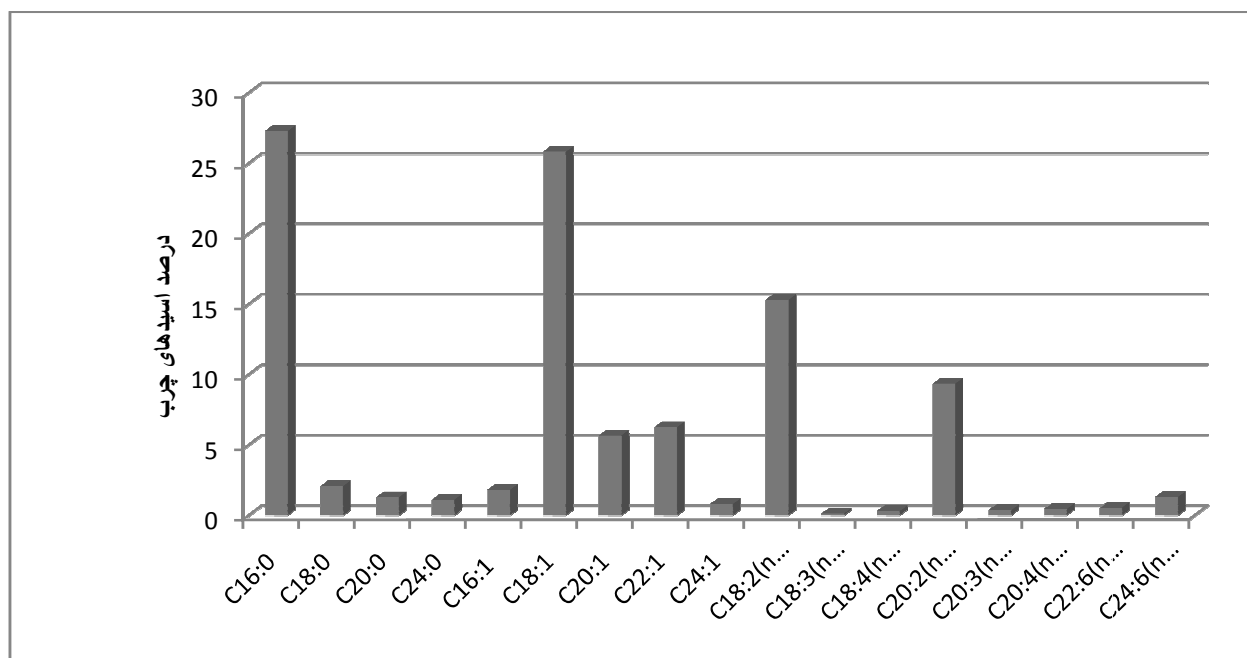
شکل ۵۰ : درصد انواع اسیدهای چرب اشباع شده با یک پیوند دو گانه در گونه Isochrysis جدا شده از سواحل سیستان و بلوچستان



شکل ۵۱ : درصد انواع اسیدهای چرب اشباع شده با چند پیوند دو گانه در گونه Isochrysis جدا شده از سواحل سیستان و بلوچستان



شکل ۵۲: درصد کل اسیدهای چرب اشباع شده (SFA)، اشباع نشده با یک پیوند دوگانه (MUFA) و اشباع نشده با چند پیوند دوگانه (PUFA) در گونه *Isochrysis sp* جدا شده از سواحل سیستان و بلوچستان



شکل ۵۳: پروفیل اسیدهای چرب در گونه *Isochrysis sp* جدا شده از سواحل استان سیستان و بلوچستان

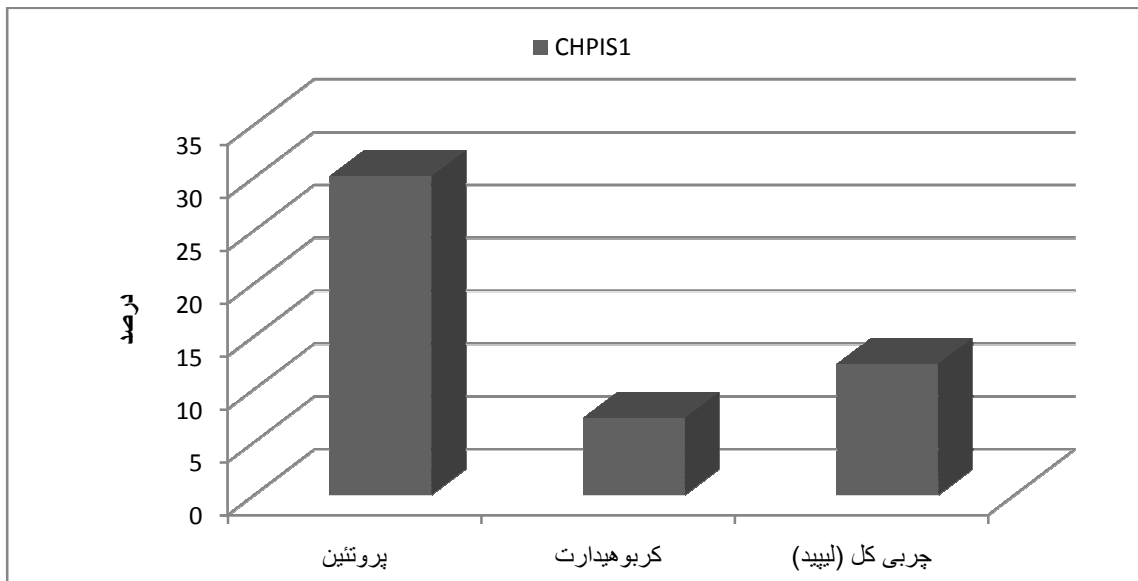
ب) کربو هیدرات، پروتئین، چربی کل

بر اساس نتایج میزان چربی کل در این گونه ۱۲.۴ درصد را تشکیل می دهد. میزان پروتئین در این گونه

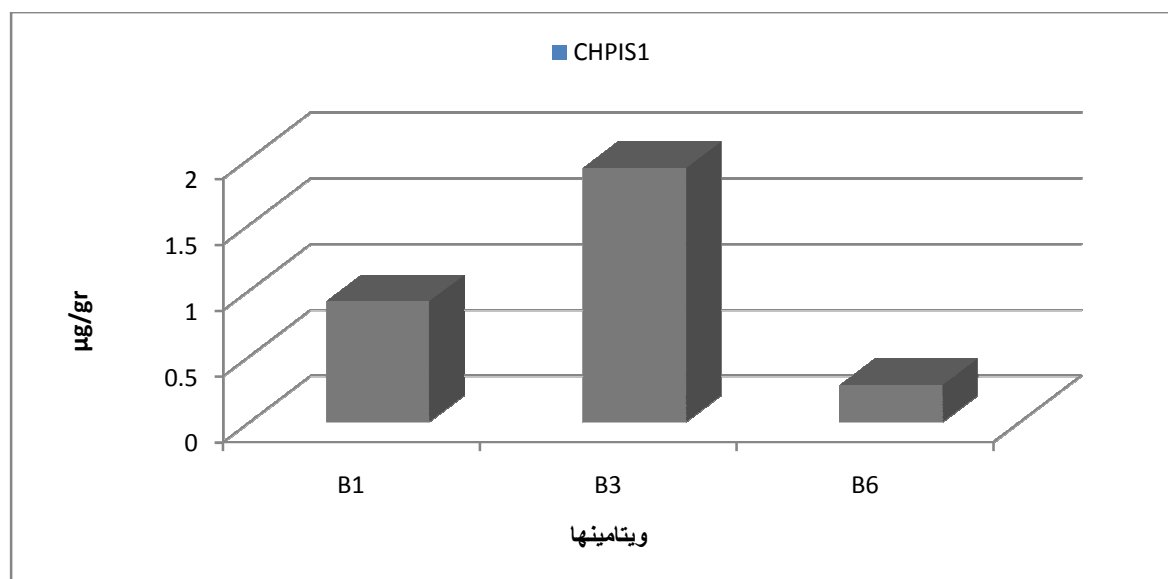
۳۰.۱۴ درصد و کربو هیدرات ۷.۲۳ درصد را تشکیل می دهد (شکل ۵۴)

از بین ویتامیهای اندازه گیری شده ویتامین B3 مقدار ۱.۹۳ میکرو گرم در گرم دارای بیشترین مقدار و

ویتامین بی ۶ با مقدار ۰.۲۸۱ میکرو گرم در گرم دارای کمترین مقدار است (شکل ۵۵)



شکل ۵۴: درصد کل چربی، پروتئین و کربو هیدرات اندازه گیری شده در گونه *Isochrysis sp.* جدا شده از سواحل چابهار



شکل ۵۵: میزان برخی از ویتامینهای محلول در آب بر حسب میکروگرم بر گرم در گونه *Isochrysis sp.* جدا شده از سواحل چابهار

این گونه به حجم بالا رسید بنا بر این پتانسیل غذایی آن مورد بررسی قرار گرفت
الف) بررسی ریخت شناسی و مولکولی گونه
طبقه بندی گونه به شرح زیر است:

Phylum *Chlorophyta* Pascher, 1914
Class Trebouxiophyceae Friedl, 1995
Order *Chlorellales*
Family *Chlorellaceae* Brunnthaler
Genus *Chlorella* Beijerinck, 1890
Chlorella vulgaris Beijerinck

نام استرین: CHCL2 , CHPCL1

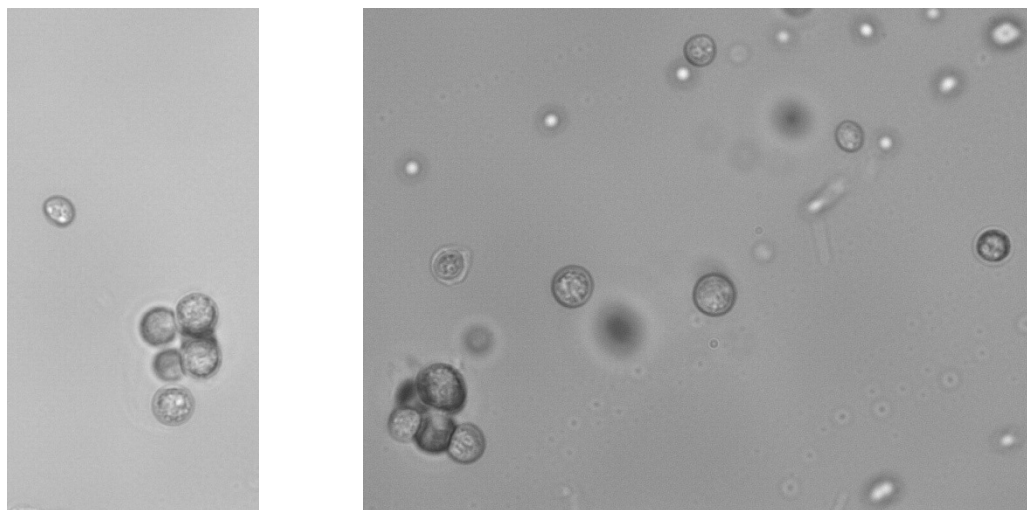
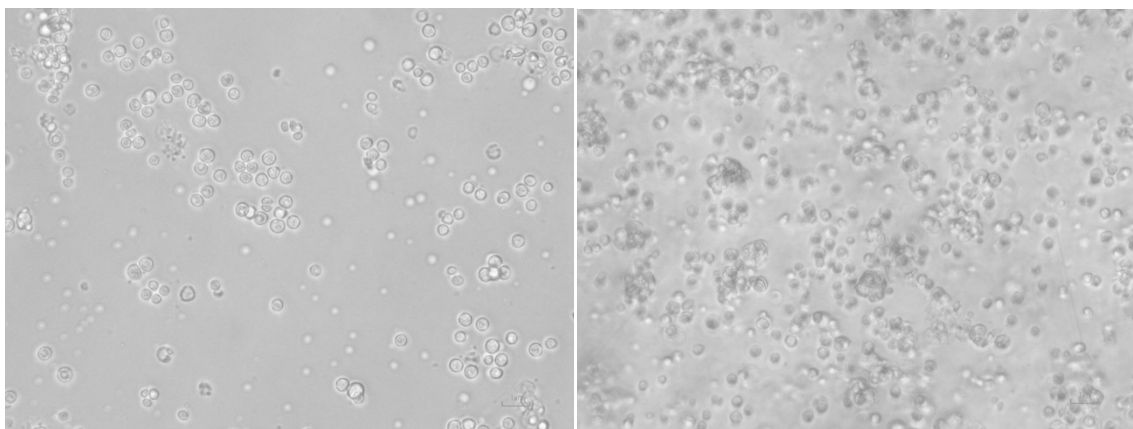
شماره ثبت در بانک ژنی:

اندازه گونه: ۹-۲ میکرومتر

رنگ استرین: سبز

از این گونه دو استرین از ایستگاههای متفاوت جدا سازی و خالص گردید یک استرین در فایکولب مرکز تحقیقات شیلات تحت شرایط ۱۲:۱۲ روشنایی تاریکی در درجه حرارت ۲۴ درجه سانتیگراد نگهداری و دیگری در ژرمناتور دانشگاه دریانوردی تحت نور ۱۰:۱۴ روشنایی: تاریکی با درجه حرارت ۲۷ درجه و نور ۲۰۰۰ لوکس نگهداری شد. نتایج نشان داد هر دو گونه به خوبی رشد کرده و بقا یافت. استرینها به نامهای CHPCL1, CHPCL2 نامگذاری گردیدند و به همین نام در بانک ژن ثبت خواهند شد. یک استرین به روش دقیق سازی و دیگری به روش کشت روی آگار جدا سازی گردیدند. سبزی گونه بین ۲-۹ می باشد. رنگ ان سبز می باشد و گرد و به صورت تکی هستند و تشکیل زنجیر نمی دهند (شکل ۵۶).

شناسایی گونه بر اساس مورفولوژی به راحتی امکان پذیر نیست و به راحتی با و دیگر گونه های گرد سبز مانند گونه های جنس *Nannochloropsis* اشتباه می شود. بنا بر این بررسی توالی ژنی آن می تواند به شناسایی گونه های ریز کمک نماید. که در این تحقیق توالی ژنی دو استرین خالص شده بررسی گردید و هر دو استرین در جنس کلرولا قرار گرفتند.



شکل ۵۶ : دو ایزوله CHPC1, CHPC2 خالص شده از سواحل سیستان و بلوچستان (شکلهای بالا X4 و شکلهای پایین X100)

بررسی نتایج آنالیزهای مولکولی نشان داد که هر دو استرین ایرانی با حمایت صد در صد (۱۰۰۰ boot strap) متعلق به جنس کلرولا بوده و هر دو استرین نزدیکترین رابطه خویشاوندی را با گونه *Chlorella vulgaris* داشته استرین دوم احتمال دارد یک زیر گونه کلرولا ولگاریس باشد. درخت های فیلوژنی که در شکلهای ۵۷-۵۹ هر استرین ابتدا جداگانه بررسی گردیده که نشان دهنده رابطه خویشاوندی نزدیک به گونه

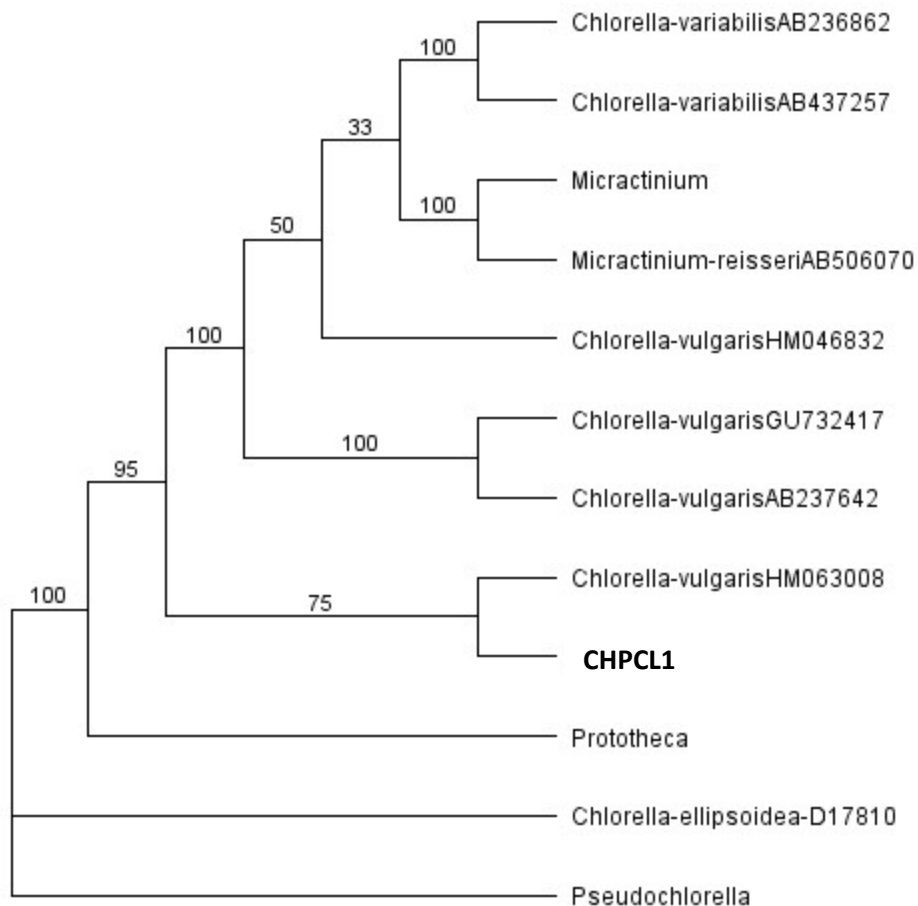
ولگاریس می باشد . سپس هر دو گونه به صورت مشترک با بقیه گونه ها توالی آنها بررسی گردیده که نتایج

آن در شکل ۵۹ مشخص می باشد. در جدول ۱۰ تمام گونه هایی که از نظر توالی ژنی با استرین های ایرانی

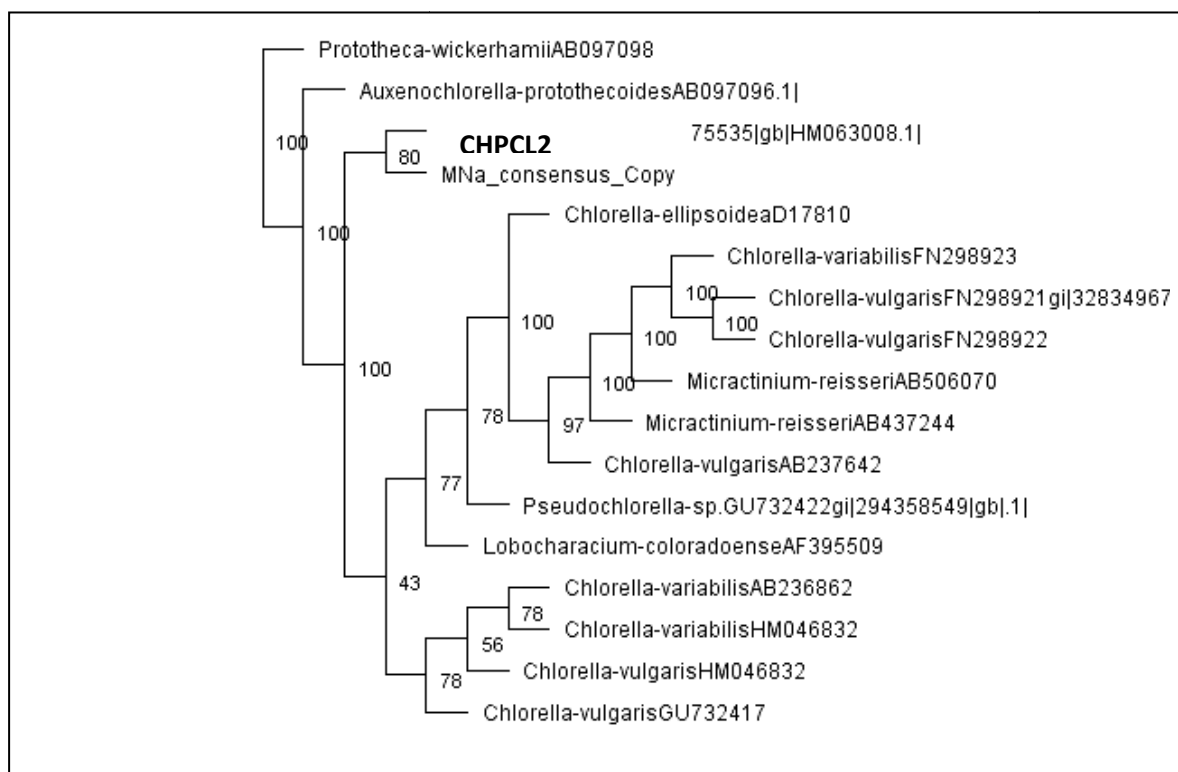
مشابه هستند و در آنالیز های مولکولی استفاده شده اند، آورده شده است.

جدول ۱۰: لیست گونه ی مورد استفاده در آنالیزهای مولکولی

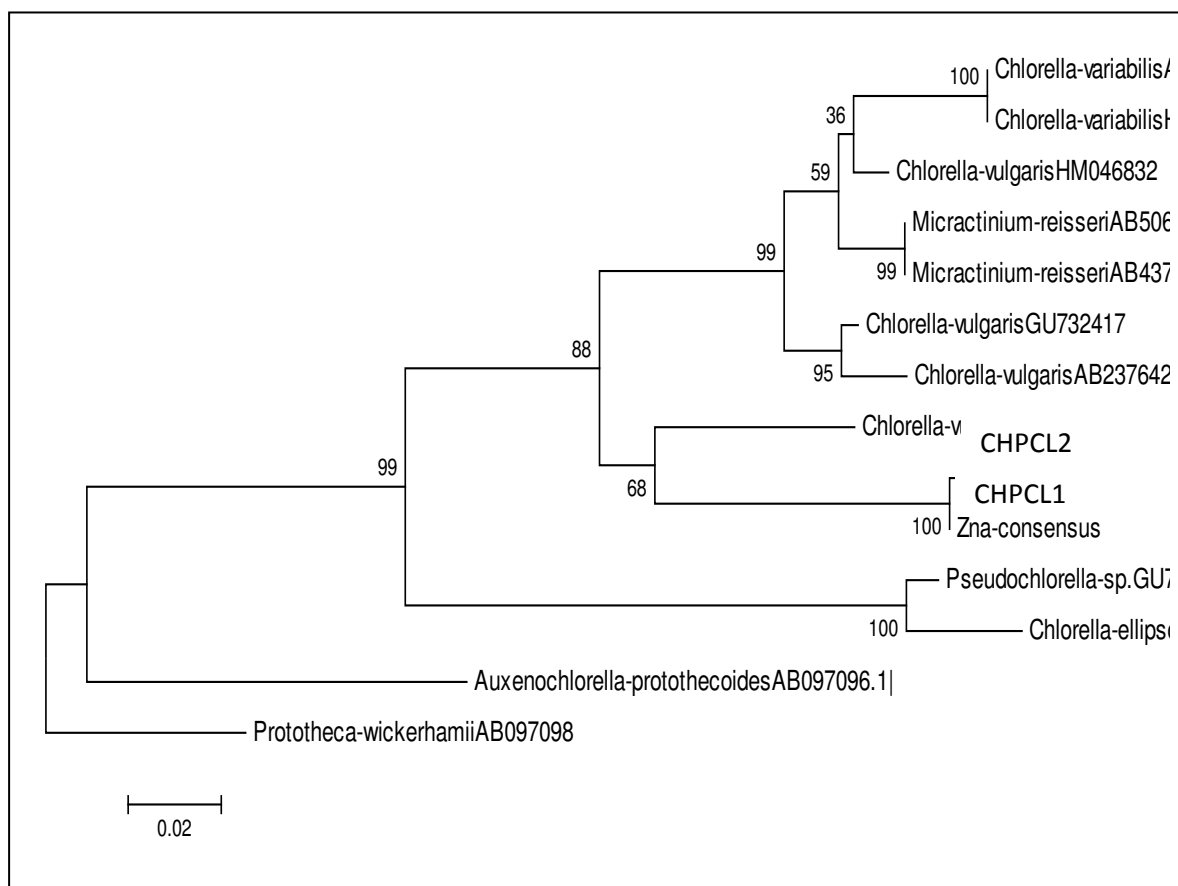
اسامی گونه ها	شماره ثبت در بانک ژن
<i>Chlorella cf. vulgaris</i>	CHPCL1
<i>Chlorella cf. vulgaris</i>	CHPCL2
<i>Chlorella vulgaris</i>	HM046832
<i>Chlorella variabilis</i>	HM046832
<i>Chlorella variabilis</i>	AB236862
<i>Chlorella vulgaris</i>	GU732417
<i>Chlorella vulgaris</i>	AB237642
<i>Prototheca wickerhamii</i>	AB097098
<i>Pseudochlorella sp.</i>	GU732422
<i>Lobocharacium coloradoense</i>	AF395509
<i>Chlorella ellipsoidea</i>	D17810
<i>Micractinium reisseri</i>	AB506070
<i>Micractinium reisseri</i>	AB437244



شکل ۵۷: درخت فیلوژنی *Chlorella cf. vulgaris* استرین CHPCL1 جدا شده از سواحل جنوب شرق ایران براساس توالی ژنی در قسمتی از ناحیه LSU با استفاده از آنالیز NJ مدل P distans و الگوی بین نسلها به صورت homogenous انتخاب گردید. اعداد bootstrap را بر اساس 100۰ replication نشان می دهند. گونه *Prototheca* عنوان outgroup انتخاب گردید



شکل ۵۸: درخت فیلوژنی گونه *chlorella cf. vulgaris* استرین CHPCL2 خالص شده از سواحل چابهار براساس توالی ژنی در قسمتی از ناحیه LSU با استفاده از آنالیز Maximum Likelihood (ML) مدل Tamura Nei روش NNJ اعداد bootstrap را بر اساس 10۰۰ replication نشان می دهند. *Prototheca wickethami* به عنوان out group انتخاب گردید.

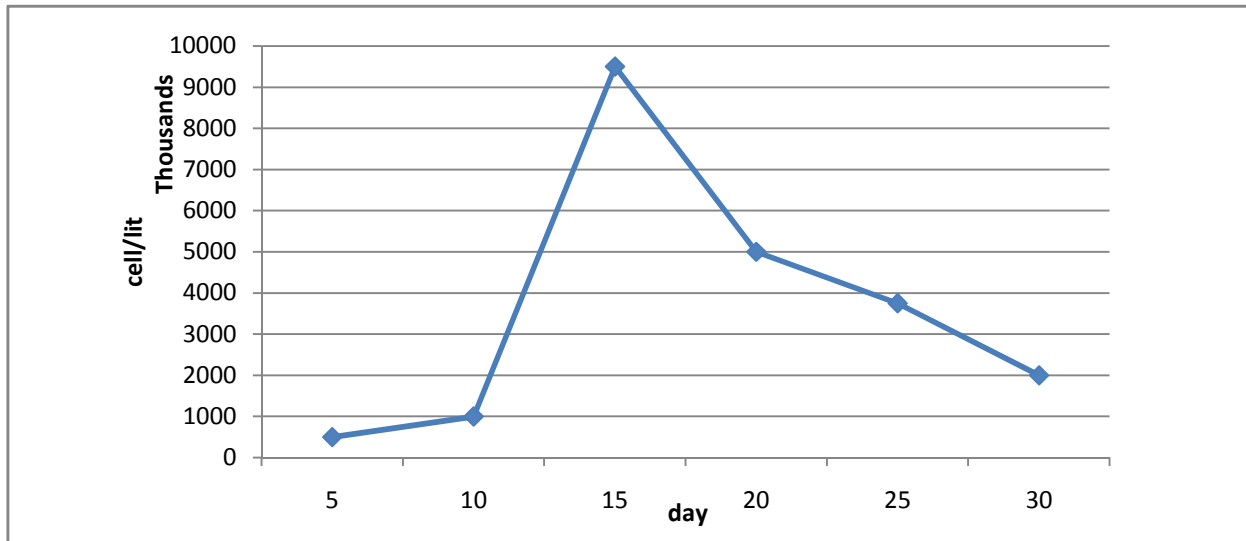


شکل ۵۹: درخت فیلوژنی گونه *chlorella cf. vulgaris* هر دو استرین CHPCL2, CHPCL1 خالص شده از سواحل چابهار براساس توالی ژنی در قسمتی از ناحیه LSU با استفاده از آنالیز (ML) مدل Jukes cantor روش NNJ اعداد bootstrap را بر اساس 10۰۰ replication نشان می دهند. *Prototheca wickethami* به عنوان out group انتخاب گردید.

(ب) رشد نسبی

گونه در محیط کشت F2 و Conway به خوبی رشد کرد. نتایج حاصل از بررسی رشد گونه طی ۳۰ روز در شکل (۶۰) مشخص می باشد. همانطور که نمودار نشان می دهد تراکم گونه ۱ در ۵ روز اول به ۱ میلیون

سلول در لیتر می رسد و نمونه بعد از دو هفته به حداکثر رشد خود رسیده و تراکم در هفته دوم به بیش از ۹.۵ برابر افزایش می یابد که نشان دهنده رشد سریع گونه است. و از روز ۲۰ به بعد وارد فاز مرگ می شود.



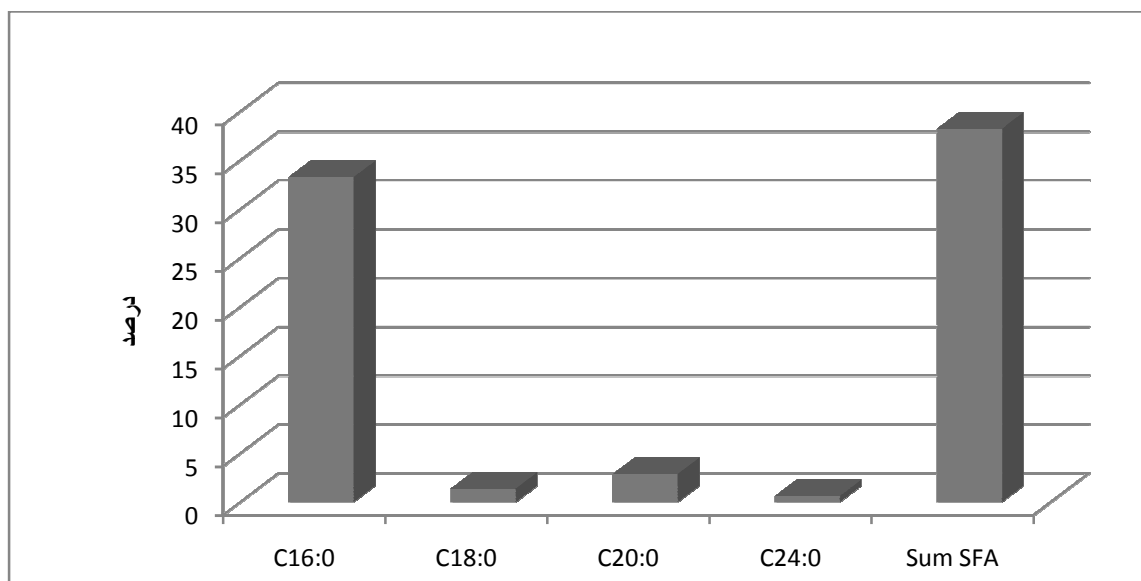
شکل ۶۰: بررسی رشد نسی گونه (*Chlorella cf. vulgaris*) جدا و خالص شده از سواحل چابهار

ج) ارزش غذایی

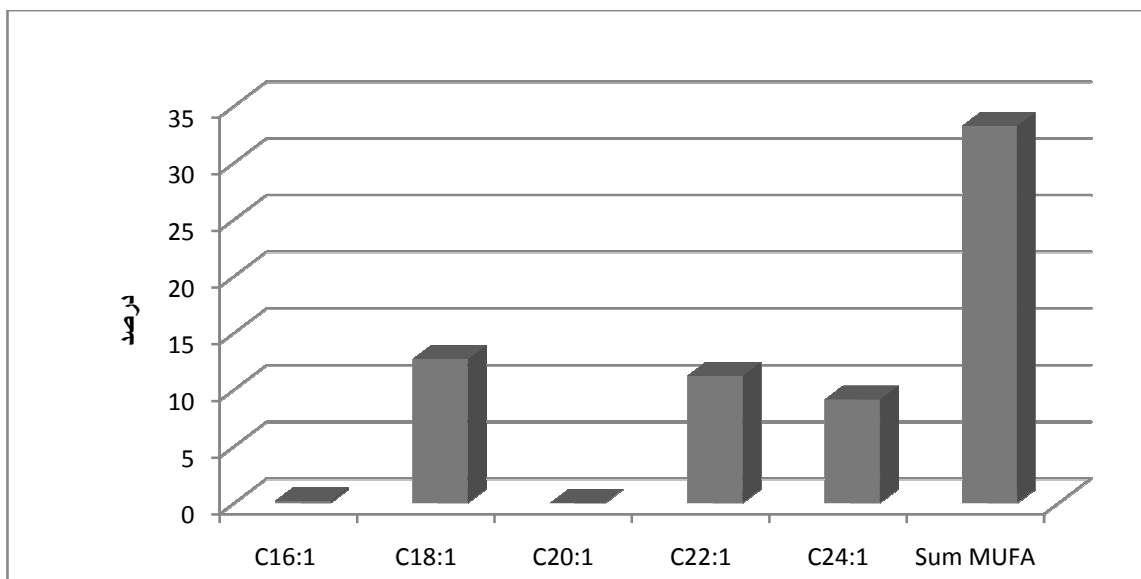
۱- اسید چرب

آنالیزهای پتانسیل غذایی نشان داد که میزان کل اسیدهای چرب در گونه *Chlorella cf. vulgaris* ۱۸.۶۲ گرم درصد می باشد. که از این مقدار ۱.۱۴۵ گرم درصد آنرا امگا ۳ تشکیل می دهد و DHA (دوکوزاهگزانوئیک اسید) بیشترین مقدار امگا ۳ که ۰.۵۴ گرم درصد است را تشکیل می دهد. و Eicosatrienoic اسید کمترین مقدار امگا ۳ را به میزان ۰.۰۶۸ گرم درصد تشکیل می دهد. اسیدهای چرب اشباع مجموعاً ۳۸.۲۵ درصد از کل اسیدهای چرب را به خود اختصاص داد. بیشترین میزان در بین این نوع از اسیدهای چرب ۳۳.۳ درصد مربوط به پالمیتیک اسید بود و کمترین مربوط به Lignoceric acid با ۰.۶۴ درصد می باشد (شکل ۶۱). ۳۳.۲۴

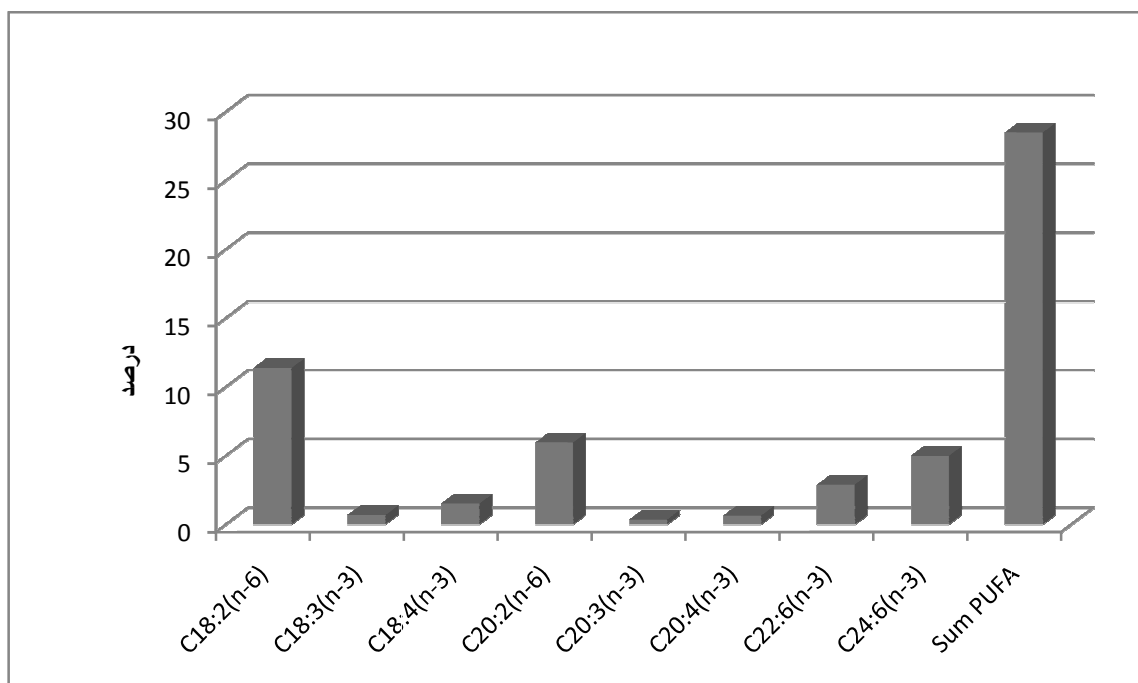
درصد از کل اسیدهای چرب را اسیدهای چرب غیر اشباع با یک پیوند دو گانه تشکیل می دهد و بیشترین مقدار ۱۲.۶۸ درصد مربوط به اولئیک اسید فاقد ایکسنوئیک اسید می باشد (شکل ۶۲). ۲۸.۵ درصد از کل اسیدهای چرب مربوط به PUFA است که بیشترین مقدار این نوع از اسیدهای چرب مربوط به لینولئیک اسید با ۱۱.۳۹ درصد و کمترین مقدار ۰.۳۵ درصد مربوط به ecosatrienoic acids می باشد (شکل ۶۳). مقایسه درصد کلی هر سه نوع اسید چرب ذکر شده و پروفیل کل اسیدهای در شکل‌های ۶۴-۶۵ نشان داده شده است.



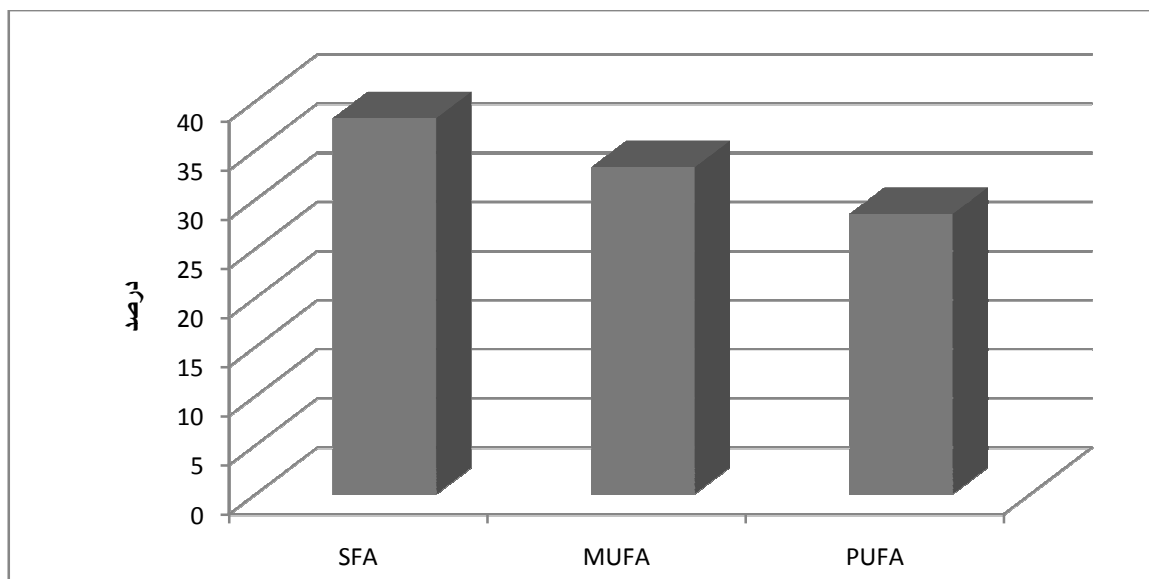
شکل ۶۱: درصد انواع اسیدهای چرب اشباع شده در گونه *Chlorella cf. vulgaris* جدا شده از سواحل سیستان و بلوچستان



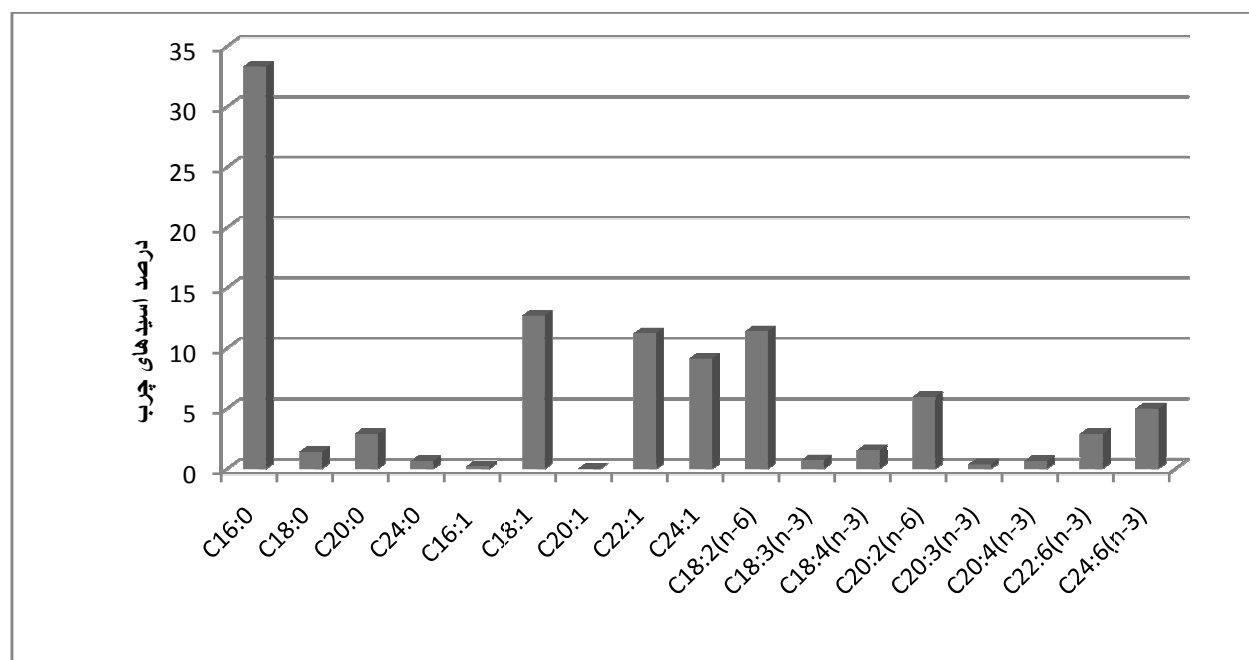
شکل ۶۲: درصد انواع اسیدهای چرب اشباع شده با یک پیوند دو گانه در گونه *Chlorella cf. vulgaris* جدا شده از سواحل چابهار



شکل ۶۳: درصد انواع اسیدهای چرب اشباع شده با چند پیوند دو گانه در گونه *Chlorella cf. vulgaris* جدا شده از سواحل چابهار



شکل ۶۴: درصد کل اسیدهای چرب اشباع شده (SFA)، اشباع نشده با یک پیوند دوگانه (MUFA) و اشباع نشده با چند پیوند دوگانه (PUFA) در گونه *Chlorella cf. vulgaris* جدا شده از سواحل سیستان و بلوچستان

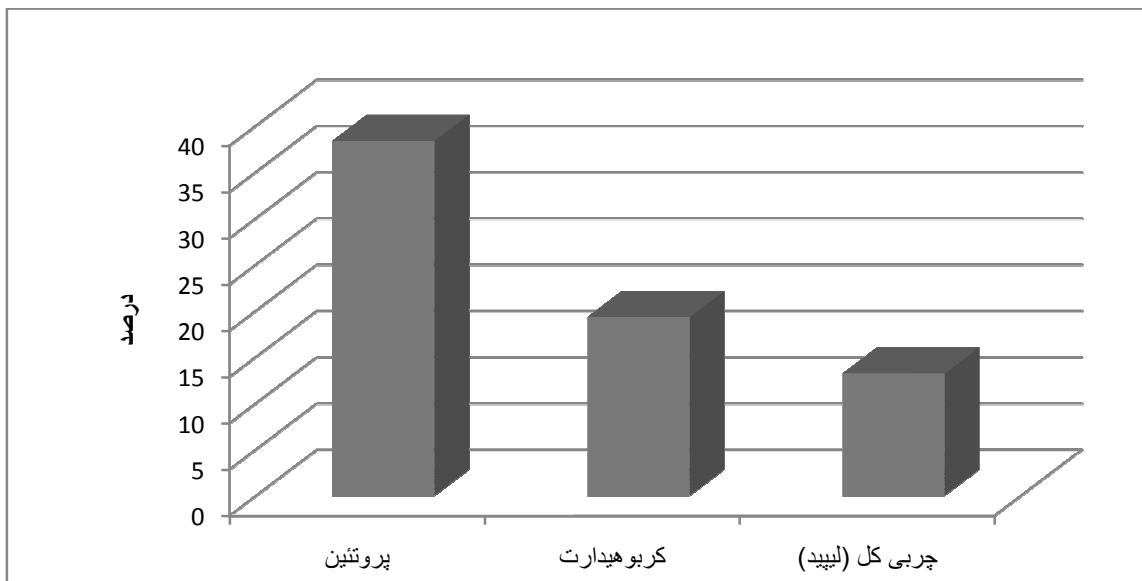


شکل ۶۵: پروفیل اسیدهای چرب در گونه *Chlorella cf. vulgaris* جدا شده از سواحل استان سیستان و بلوچستان

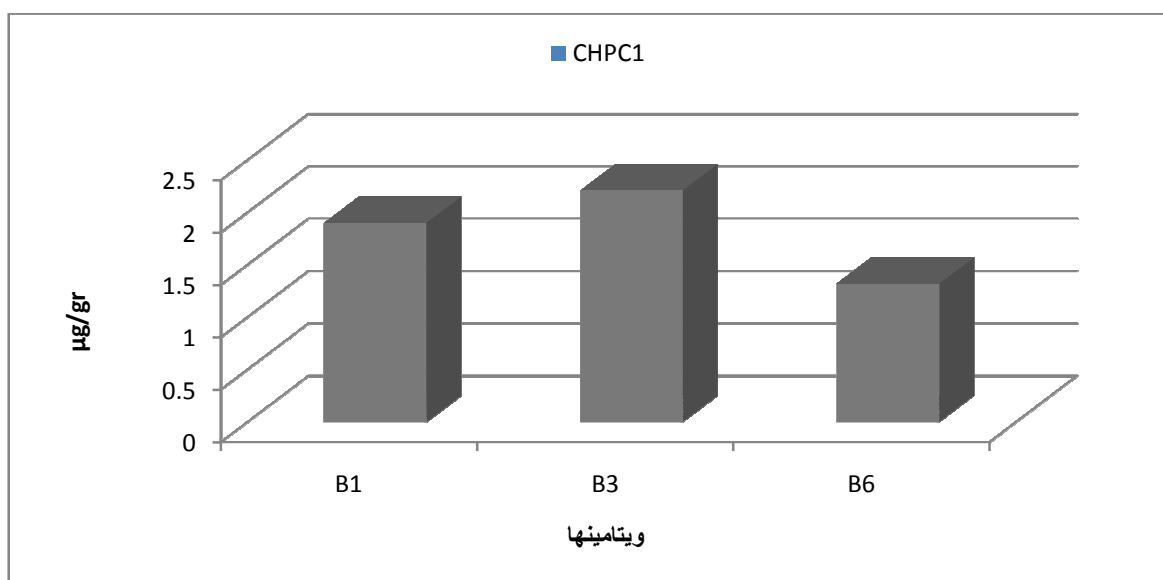
۲- کربوهیدرات، پروتئین، چربی و ویتامینها

دو استرین گونه *Chlorella cf. vulgaris* از نظر توالی ژنتیکی بسیار نزدیک به هم هستند لذا با توجه به آنالیزهای مولکولی اندازه گیری کربوهیدرات و پروتئین و چربی کل در یکی از دو استرین جدا شده و خالص شده گونه تعیین گردید. نتایج نشان داد که میزان پروتئین اندازه گیری شده ۳۸.۳۶ درصد کربو هیدرات در این گونه ۱۹.۳۱٪ و چربی کل ۱۳.۲٪ می باشد (شکل ۶۵).

نتایج اندازه گیری ویتامینهای محلول در آب (B3, B1, B6) نشان داد که ویتامین B3 با میزان ۲.۲۱ میکرو گرم در گرم بیشترین مقدار را به خود اختصاص داده است. ویتامین B شش دارای کمترین مقدار یعنی ۱.۳۲ میکرو گرم در گرم است. لازم به ذکر است بقیه ویتامینهای محلول در آب و چربی به اندازه ای کم بودند که توسط دستگاه HPLC به صورت ND= not detectable نشان داده شدند (شکل ۶۷).



شکل ۶۶: درصد چربی کل ، پروتئین و کربوهیدرات اندازه گیری شده در گونه *Chlorella cf. vulgaris* جدا شده از سواحل چابهار



شکل ۶۷ : میزان برخی از ویتامینهای محلول در آب بر حسب میکروگرم بر گرم در گونه *Chlorella cf. vulgaris* جدا شده از سواحل چابهار

10- *Synechococcus* sp.

گونه بعد از خالص سازی و شناسایی به حجم بالا رسانده شد و پتانسیل غذایی آن بررسی گردید

الف) آنالیز های مورفولوژی

طبقه بندی گونه به شرح زیر است:

Phylum: Cyanobacteria Stanier ex Cavalier Smith

Class: Cyanophyceae Schaffner

Order: Synechococcales

Family: Synechococcaceae Komárek & Anagnostidis

Genus: *Synechococcus* Nägeli

Species: *Synechococcus* sp.

نام استرین : CHPSy1، CHPSy2

اندازه گونه : ۲-۴ میکرومتر

رنگ استرین : استرین اول سبز روشن در محیط کشت F2: ایزوله دوم سبز لجنی در محیط کشت اختصاصی

سیانو باکتریها

گونه *Synechococcus* sp از گونه های سبز بدون حرکت است بررسی مورفولوژی گونه نشان داد که گونه

شباهت زیادی به گونه های جنس سینکوکوس دارد. شکل سلولها بیشتر بیضی یا کوکوئید شکل و میله مانند

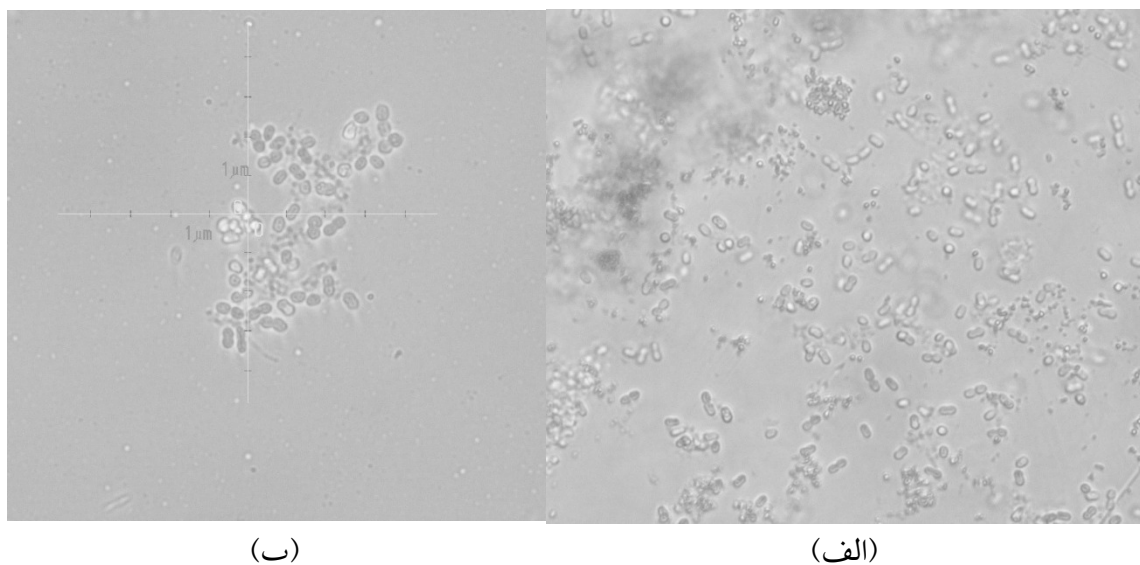
است کمتر به صورت سلولهای گرد دیده می شوند. اندازه سلولها ۲-۴ میکرومتر طول و ۱-۲ میکرومتر

عرض دارند. این گونه هم به صورت تکی است و همینطور به صورت گروهی متشکل از دو سلول می باشد

.گاهی سلولها به صورت خوشه های نامنظم کنار هم دیده می شوند (شکل ۶۸) به نظر می رسد که لایه

موسیلاژ (Mucilage) ندارند و اگر هم دارند به صورت خیلی ضعیف اطراف خوشه ها قابل مشاهده است.

رنگ آن سبز است و کشت انبوه گونه به رنگ سبز روشن که روشن تر از رنگ استرین کلرلا می باشد . استخراج DNA و PCR این گونه موفقیت آمیز بود ولی پس از ارسال برای توالی یابی جواب درستی دریافت نگردید. و لازم است مجددا نمونه جهت تعیین توالی ژنی رسال گردد. گونه به روش رقیق سازی جدا سازی گردید در محیط کشت های مختلف به خوبی رش کرده ولی نهایتا گونه در محیط کشت F2 کشت داده شد و تعویض کشت آن هر دو هفته یک بار صورت می گیرد کشت انبوه آن در محیط کان وی انجام شد . شکلهای ۶۸ الف و ب موفولوژی کلی گونه را نشان می دهد.

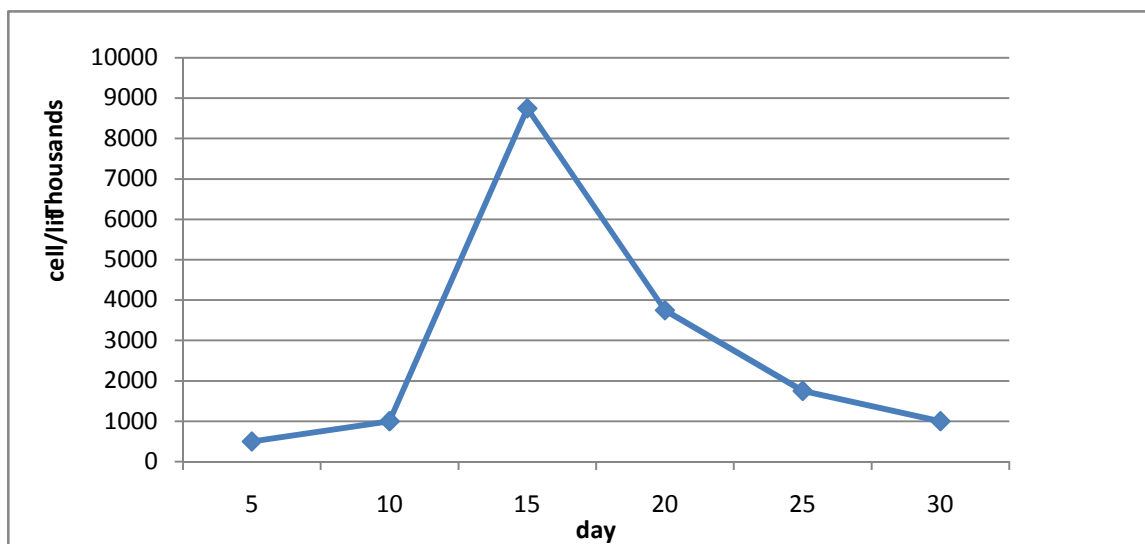


شکل ۶۸: گونه *Synechococcus sp.* جدا و خالص شده از سواحل چابهار. الف) سلولهای کوکوئید و میله ای شکل به صورت سلولهای تکی و دو تایی . ب) سلولها به صورت خوشه ای نامنظم با لایه ضعیف موسیلاژ

ب) رشد نسبی

بررسی رشد نسبی گونه در طی ۳۰ روز نشان داد که از روز ۵ تا ۱۵ تا ۹ برابر افزایش رشد نشان می

دهد. و بعد از آن تراکم گونه کاهش می یابد (شکل ۶۹)



شکل ۶۹: رشد نسبی گونه گونه *Synechococcus sp.* طی ۳۰ روز بررسی

ج) بررسی پتانسیل غذایی گونه

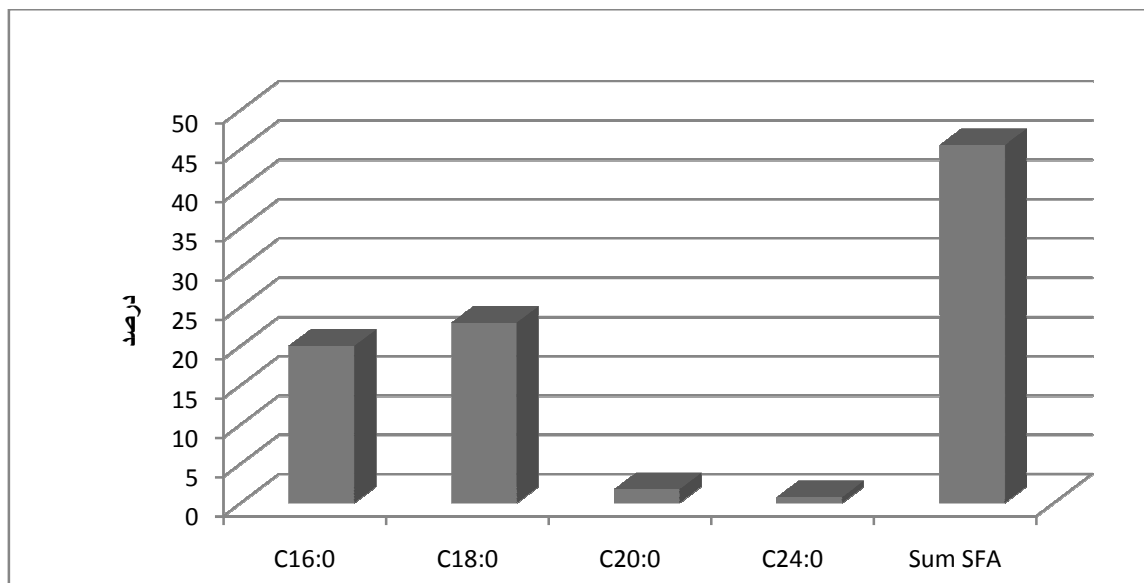
۱- اسیدهای چرب

میزان کل اسیدهای چرب در این گونه ۱۹.۵۶ گرم درصد می باشد که از ۰.۵۳۴ گرم درصد آنرا امگا ۳ تشکیل می دهد و بیشترین مقدار امگا ۳ متعلق به C18:4 با میزان ۰.۲۶ گرم درصد می باشد. اسیدهای چرب اشباع شده ۴۵.۵۵ درصد از کل اسیدهای چرب را تشکیل می دهد (شکل ۷۵) و بیشترین مقدار اسید چرب اشباع را C18:0 با مقدار ۲۲.۵۷ درصد تشکیل می دهد. و کمترین مقدار را (C24:0) با میزان ۰.۴۷ درصد تشکیل می دهد. اسیدهای چرب غیر اشباع با یک پیوند دو گانه ۴۰.۴۹ درصد از کل اسیدهای چرب را تشکیل می دهند که بیشترین درصد را اسید اولئیک با مقدار ۱۳.۵۷ درصد تشکیل می دهد و کمترین مقدار در این گروه از اسیدهای چرب را اسید پالمیتولئیک با مقدار ۱.۲ درصد تشکیل می دهد. اسیدهای چرب غیر اشباع با چند پیوند دو گانه ۱۳.۹۲ درصد از کل اسیدهای چرب را تشکیل می دهد که بیشترین مقدار آن

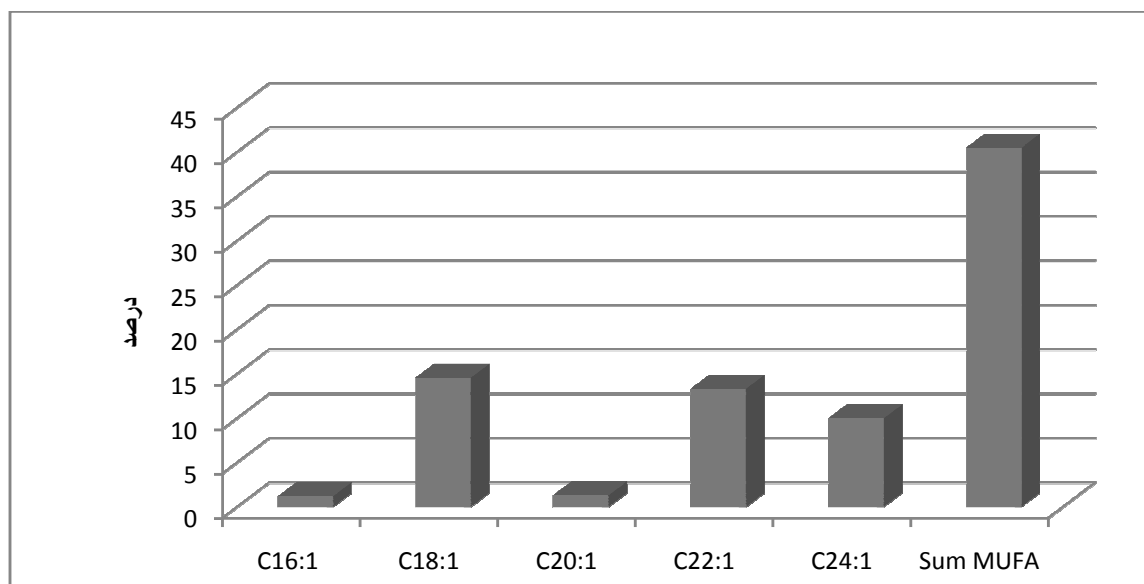
مربوط به اسید لینولئیک با مقدار ۹.۶ درصد و کمترین میزان ۰.۰٪ متعلق به ایکوسترینوئیک (eicosatrienoic

acid: ETE می باشد (شکل ۷۰ و ۷۱). مقایسه درصد هر سه دسته اید چرب و پروفیل کل اسید های چرب در

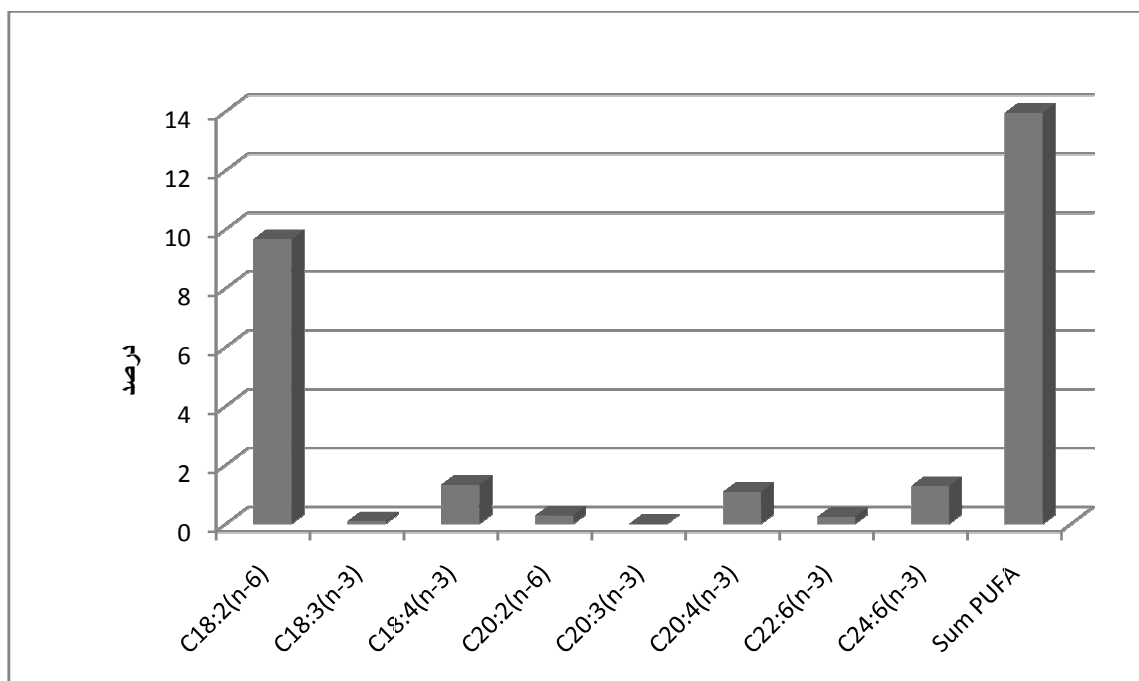
شکلهای ۷۲ و ۷۳ نشان داده شده است



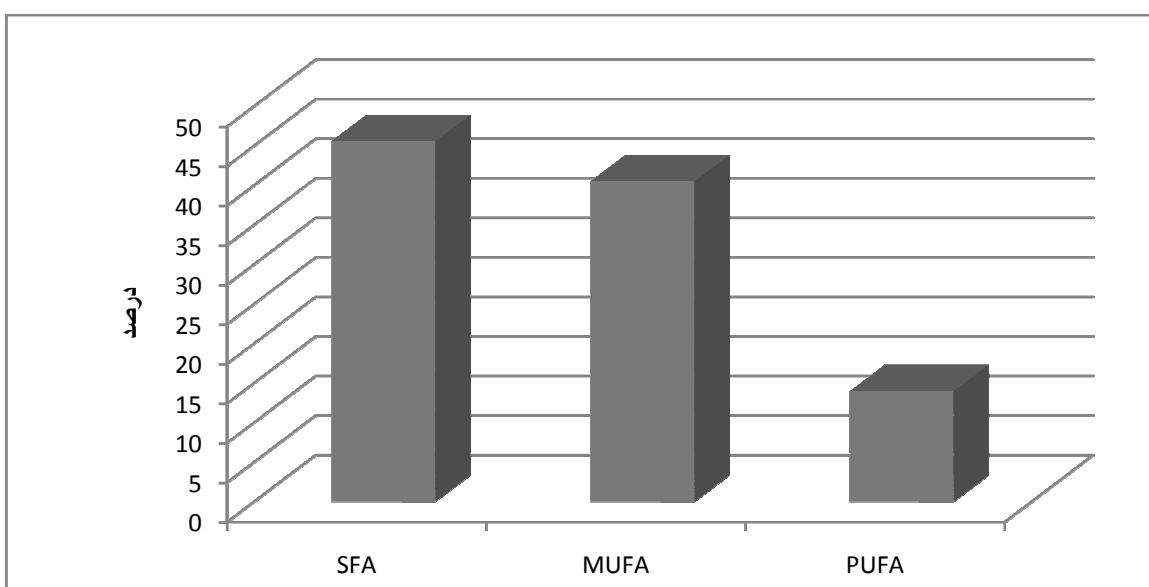
شکل ۷۰: درصد انواع اسیدهای چرب اشباع شده در گونه *Synechococcus sp* جدا شده از سواحل چابهار



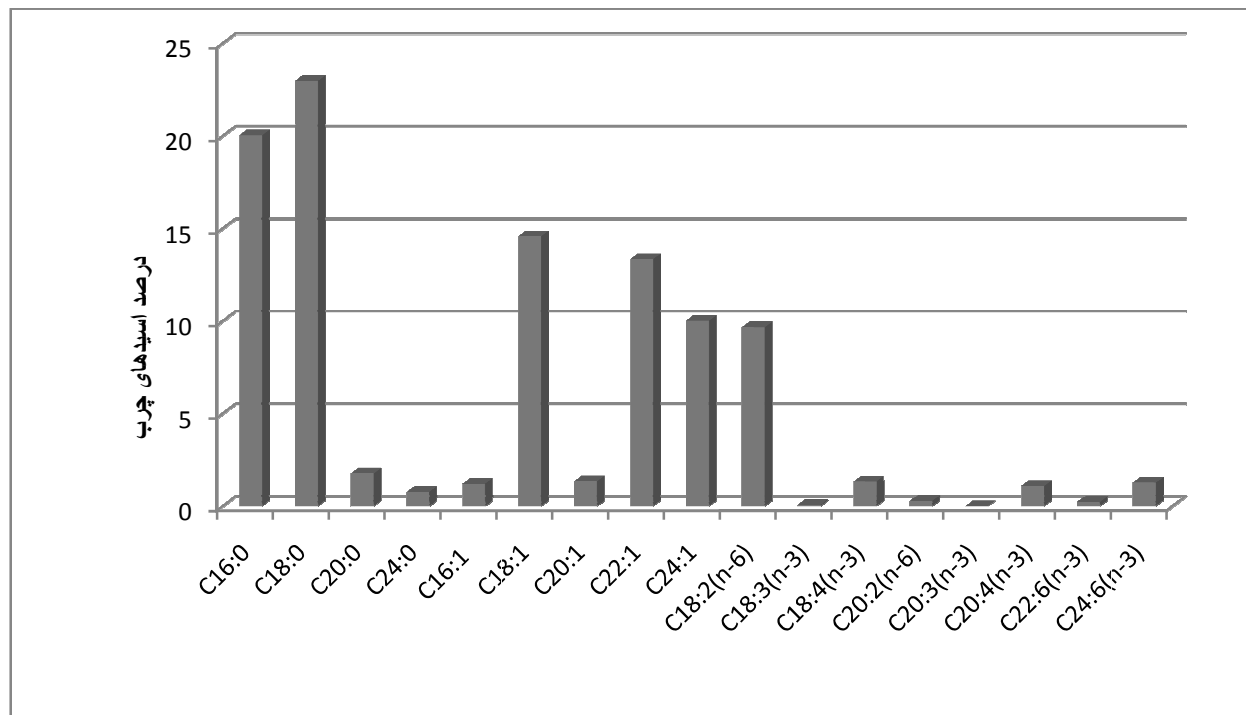
شکل ۷۱: درصد انواع اسیدهای چرب اشباع شده با یک پیوند دو گانه در گونه *Synechococcus sp* جدا شده از سواحل چابهار



شکل ۷۲: درصد انواع اسیدهای چرب اشباع شده با چند پیوند دو گانه در گونه *Synechococcus sp* جدا شده از سواحل چابهار



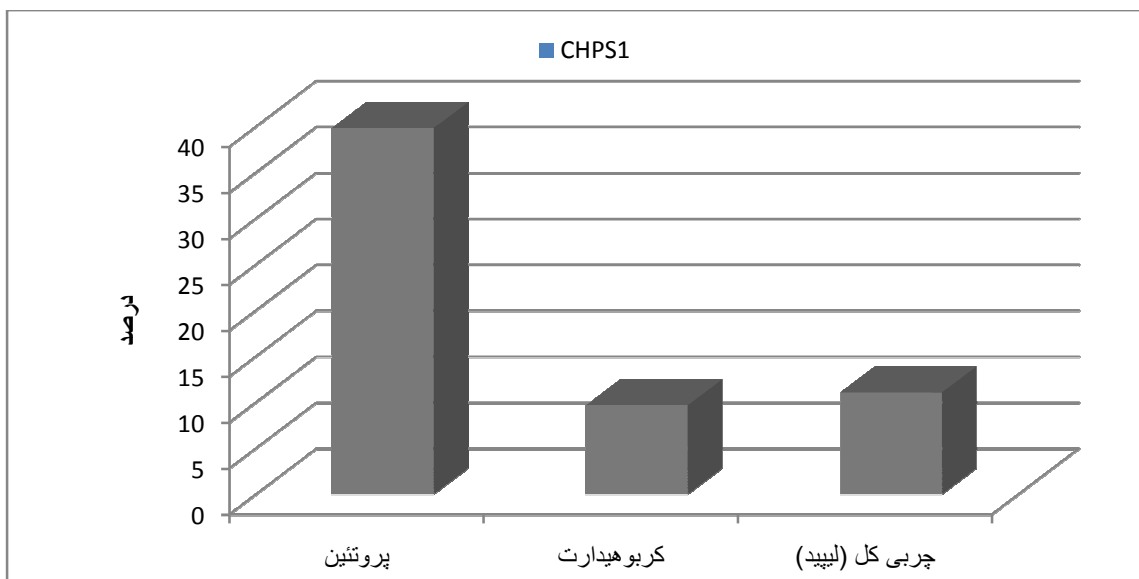
شکل ۷۳: درصد کل اسیدهای چرب اشباع شده (SFA)، اشباع نشده با یک پیوند دوگانه (MUFA) و اشباع نشده با چند پیوند دوگانه (PUFA) در گونه *Synechococcus sp* جدا شده از سواحل سیستان و بلوچستان



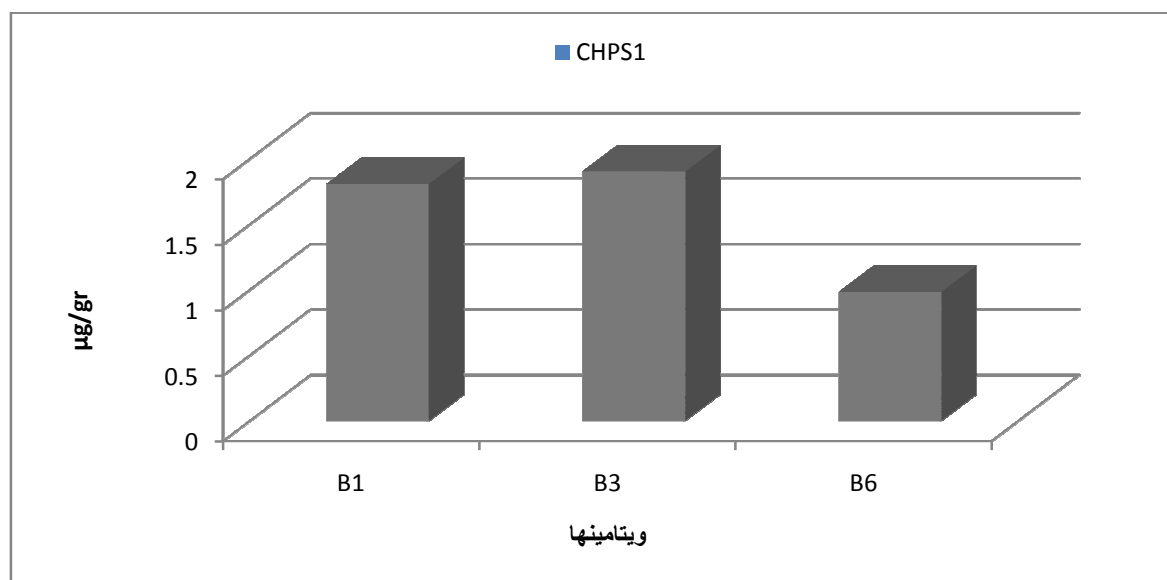
شکل ۷۴: پروفیل اسیدهای چرب در در گونه *Synechococcus sp* جدا شده از سواحل چابهار

۲- پروتئین، چربی، کربو هیدرات و ویتامینها

نتایج نشان داد که میزان پروتئین در گونه نسبتاً بالا ۳۹.۸۶ درصد می باشد و کربو هیدرات در این گونه ۹.۷ درصد را تشکیل می دهد. مقدار لیپید ۱۱.۰۹ درصد است. اگر چه تعیین ویتامینها در این پروژه مد نظر نبوده است و اندازه گیری شد ولی کل ویتامینها محلول در چربی Not detected تعیین گردید که احتمالاً به خاطر روش اندازه گیری آنها بوده است. از میان انواع ویتامینهای اندازه گیری شده ویتامین B3 با ۱.۰۹ میکرو گرم در گرم دارای بالاترین مقدار و ویتامین B6 کمترین مقدار را به خود اختصاص داده است (شکل های ۷۵-۷۶).



شکل ۷۵: درصد چربی کل ، پروتئین و کربوهیدرات اندازه گیری شده در گونه *Synechococcus sp*



شکل ۷۶ : میزان برخی از ویتامینهای محلول در آب بر حسب میکروگرم بر گرم در *Synechococcus sp* جدا شده از سواحل چابهار

11. Unknown species sp1

گونه بعد از خالص سازی مورد بررسی مولکولی قرار گرفت ولی آنالیزهای مولکولی ناموفق بوده بنا بر این به دلیل اندازه بسیار ریز گونه شناسایی نگردید. گونه خالص در حجم بالا کشت داده شده و مورد ارزیابی پتانسیل غذایی هم قرار گرفت.

الف) بررسی ریخت شناسی گونه

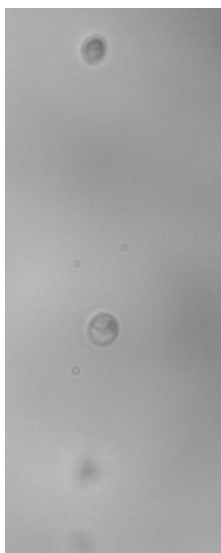
نام استرین: CHPUN1

اندازه گونه : ۲.۷-۳.۹ میکرومتر

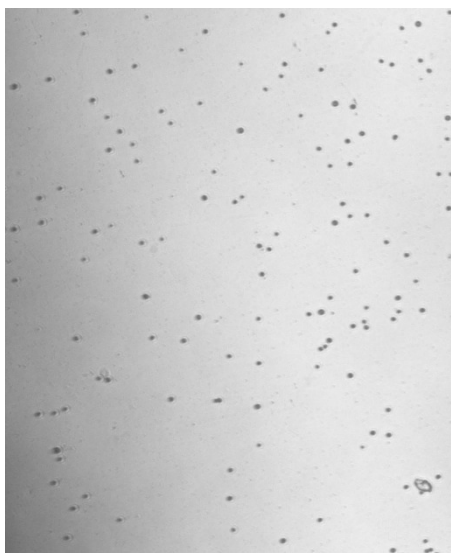
رنگ استرین: سبز

سلولها ی این گونه بیضی تا گرد می باشد به صورت انفرادی دیده می شوند و تشکیل زنجیره یا کلنی نمی دهند (شکل ۷۷). رنگ تک سلولها سبز و ایزوله خالص شده آن هم به رنگ سبز دیده می شود رنگ سبز آن با گونه قبلی متفاوت است به طوریکه روشن تر از گونه سینکوکوس می باشد. اندازه سلولها آن بین این گونه بین ۲.۷-۳.۹ میکرو متر می باشد. شناسایی گونه تنها با تکیه بر میکروسکوپ نوری بسیار مشکل است زیرا بسیاری از گونه های میکرو الگهای سبز دارای شکل مشابه با این گونه هستند بنا بر این به دلیل اندازه ریز آن و شکل گرد تا بیضی حتی در حد جنس هم با استفاده میکروسکوپ نوری قابل شناسایی نبود. دلیل تفکیک گونه از گونه های مشابه سبز در این مطالعه سائز ریز شکل و رنگ ایزوله خالص شده بود. نتایج آنالیز مولکولی به منظور شناسایی گونه در مرحله توالی یابی sequencing موفقیت آمیز نبوده و لازم به تکرار آزمایشات مولکولی دارد، تا بتوان نزدیکترین خویشاوند را از نظر ژنی مشخص کرد و حداقل در حد جنس

گونه را شناسایی نمود. این گونه سبز به حجم انبوه رسیده و در محیط رایج F2 به خوبی رشد می کند. گونه با روش رقیق سازی خالص گردیده است.



(ب)

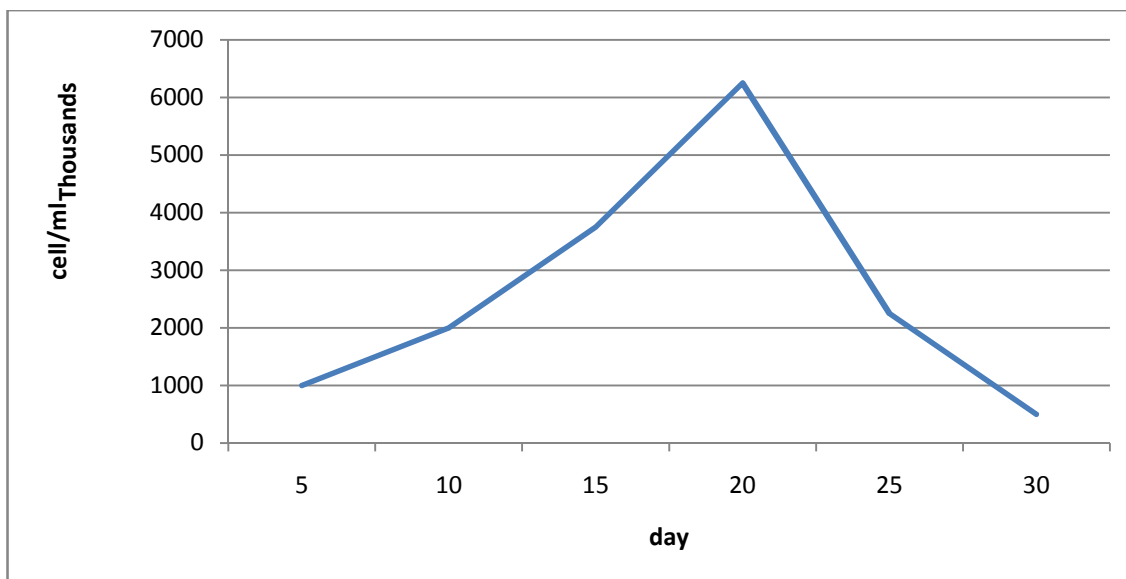


(الف)

شکل ۷۷: گونه ناشناخته ایزوله CHPU1 جدا شده از سواحل چابهار: الف (4x ب) 100x

(ب) رشد نسبی

شکل ۷۸ رشد نمونه را طی ۳۰ روز بررسی نشان می دهد. گونه به حداکثر رشد لگاریتمی خود در روز ۲۰ می رسد. بعد از ۲۰ روز تراکم سلولها به بیش از ۶ برابر افزایش می یابد. رشد این گونه نسبت به گونه قبلی در شرایط یکسان کند تر است.



شکل ۷۸: رشد نسبی استرین CHPUN1 طی ۳۰ روز بررسی خالص شده از سواحل چابهار

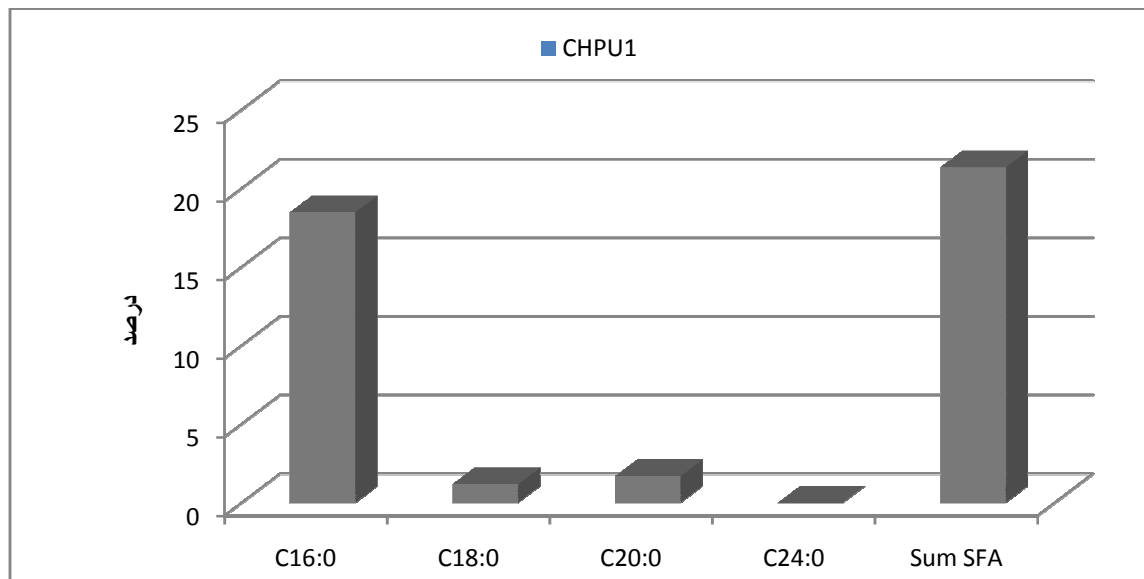
ج) آنالیز پتانسیل غذایی

۱- اسیدهای چرب

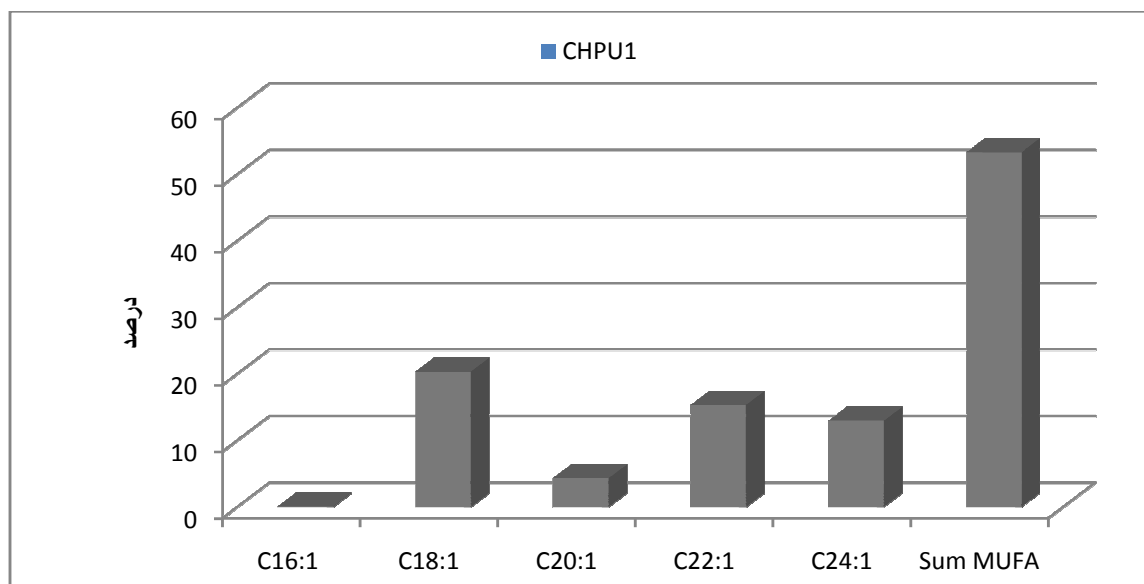
میزان کل اسیدهای چرب در این گونه ۲۰.۷۳ گرم درصد می باشد که ۱.۱۷ گرم درصد آنرا امگا ۳ تشکیل می دهد و بیشترین را مقدار امگا ۳ با میزان ۰.۵۳ گرم درصد مربوط به اسید لینولئیک می باشد. اسیدهای چرب اشباع ۲۱.۳۴ شده درصد از کل اسیدهای چرب را تشکیل می دهد (شکل ۸۴). که بیشترین مقدار مربوط به اسید پالمیتیک سی ۱۶ با مقدار ۱۸.۴۷٪ می باشد. ۵۳.۳۳ درصد از کل اسیدهای چرب را اسیدهای چرب غیر اشباع با یک پیوند دو گانه تشکیل می دهد که بیشترین مقدار آنرا اسید اولئیک سی ۱۸:۱ با مقدار ۲۲.۳۵ درصد تشکیل می دهد (شکل ۷۹). اسیدهای چرب غیر اشباع با چند پیوند دو گانه ۲۵.۳ درصد از کل اسیدهای چرب را تشکیل می دهد که بیشترین مقدار آن مربوط به سی ۲۴:۶ است و کمترین مقدار آن

مربوط $C_{20:2,4}$ که صفر درصد می باشد (شکل ۸۰). مقایسه هر سه دسته اسید چرب در این گونه و پروفیل

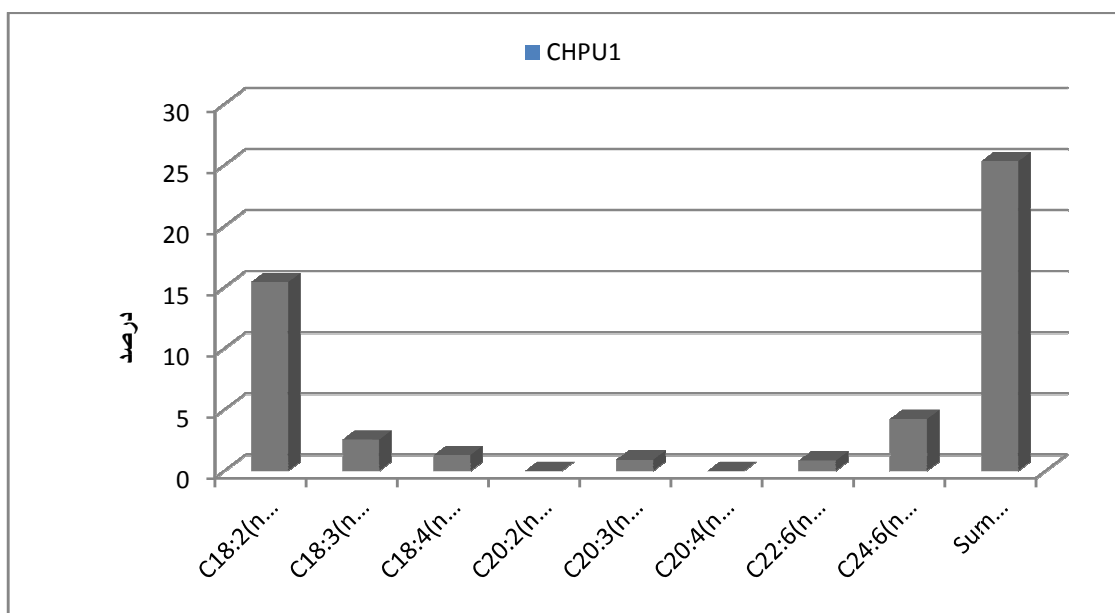
اسیدهای چرب در شکل‌های ۸۱ و ۸۲ نشان داده شده است



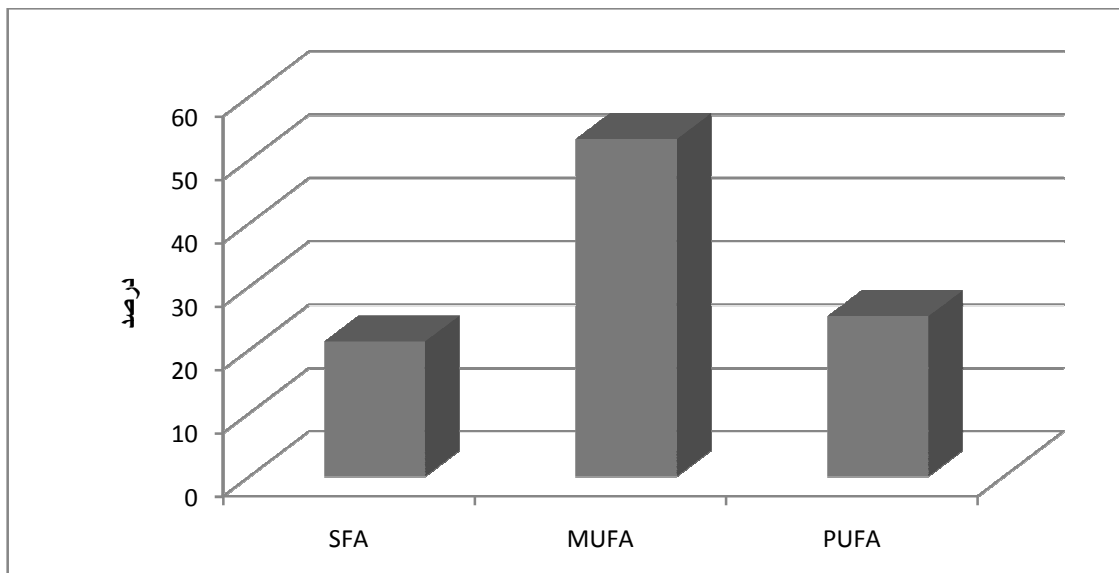
شکل ۷۹: درصد انواع اسیدهای چرب اشباع شده در گونه ناشناخته ایزوله CHPU1 جدا شده از سواحل چابهار



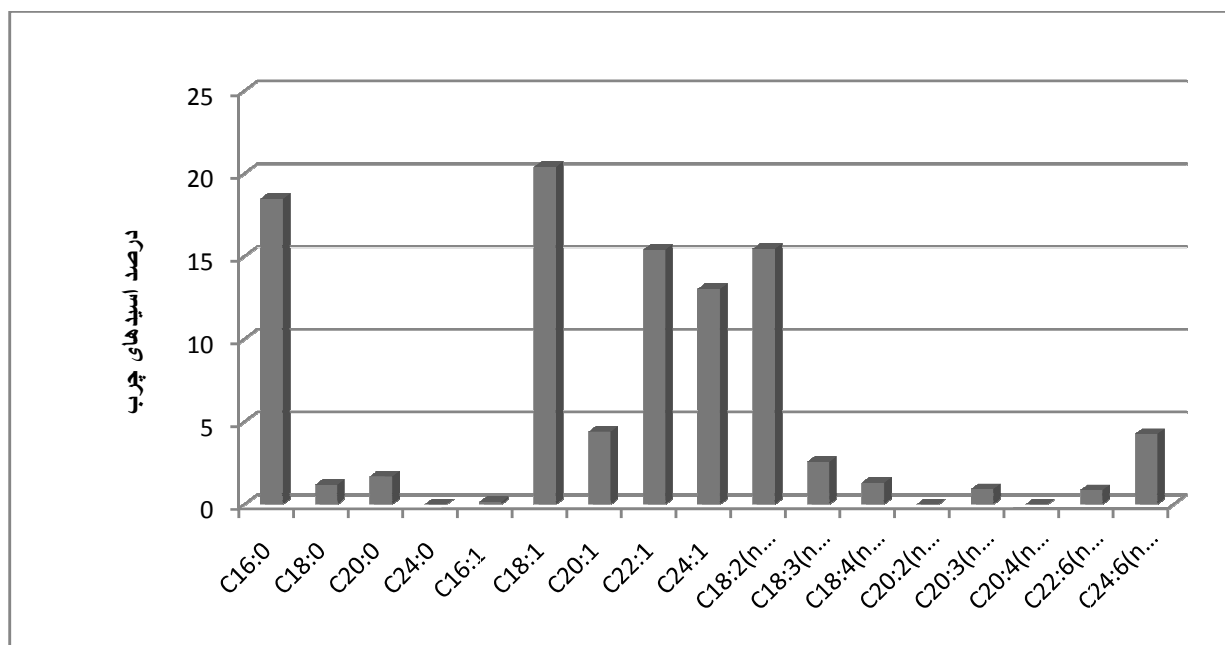
شکل ۸۰: درصد انواع اسیدهای چرب اشباع شده با یک پیوند دو گانه در گونه ناشناخته ایزوله CHPUN1 جدا شده از سواحل چابهار



شکل ۸۱: درصد انواع اسیدهای چرب اشباع شده با چند پیوند دو گانه در گونه ناشناخته ایزوله CHPUN1 جدا شده از سواحل چابهار



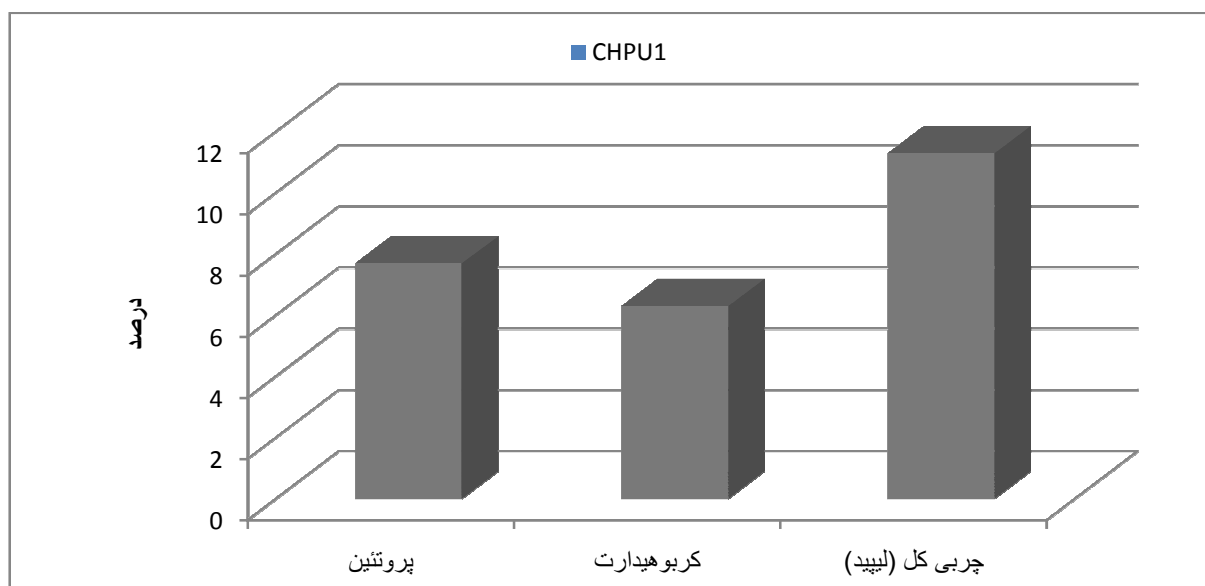
شکل ۸۲: درصد کل اسیدهای چرب اشباع شده (SFA)، اشباع نشده با یک پیوند دو گانه (MUFA) و اشباع نشده با چند پیوند دو گانه (PUFA) در گونه unknown 1 در استرین CHPU1 جدا شده از سواحل چابهار



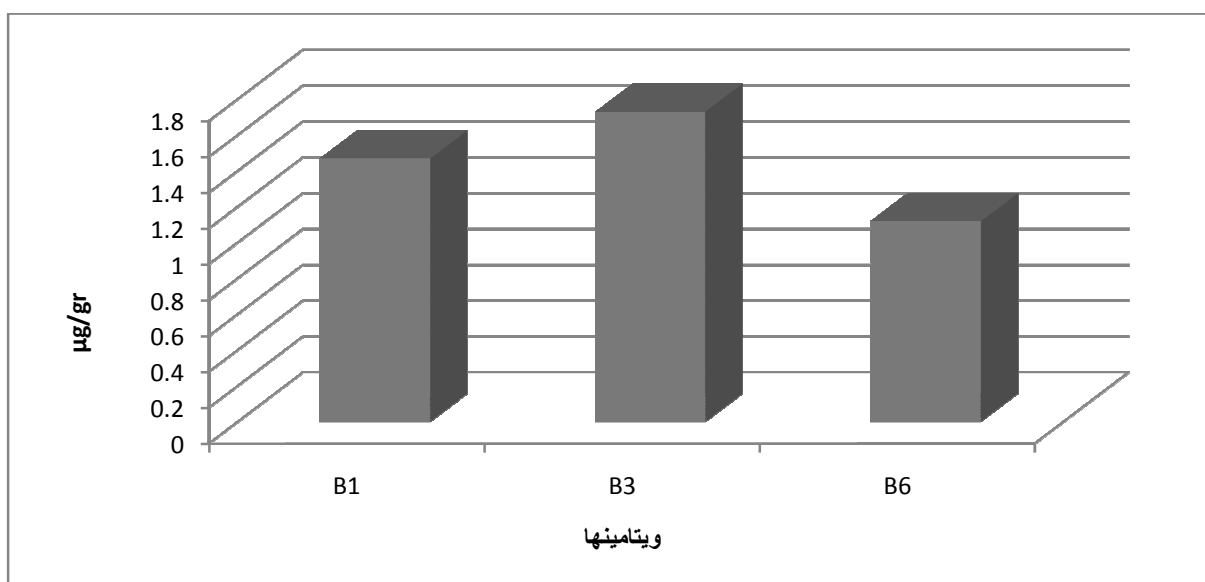
شکل ۸۳: پروفیل اسیدهای چرب در گونه unknown 1 در استرین CHPUN1 جدا شده از سواحل چابهار

۲- کربو هیدرات، پروتئین و ویتامینها

بر اساس نتایج میزان چربی کل در این گونه ۱۱.۳ درصد و کربو هیدرات ۱۹.۳ درصد و پروتئین ۳۵.۸٪ را تشکیل می دهد. از میان ویتامینهای اندازه گیری شده بیشترین مقدار متعلق به ویتامین بی ۳ با مقدار ۱.۷۳ گرم درصد می باشد (شکلهای ۸۹ و ۹۰)



شکل ۸۴: درصد کل چربی، پروتئین و کربوهیدرات اندازه گیری شده در گونه unknown 1 در استرین جدا شده از سواحل چابهار



شکل ۸۵: میزان برخی از ویتامینهای محلول در آب بر حسب میکروگرم بر گرم در گونه unknown 1 در استرین جدا شده از سواحل چابهار

11- Unknown species sp.2

این گونه هم آنالیزهای مولکولی آن ناموفق بوده بنا بر به عنوان گونه دوم ناشناخته در این پروژه معرفی می گردد گونه به حجم بالا رسید و پتانسیل غذایی آن بررسی گردید
الف) آنالیزهای مورفولوژی
طبقه بندی گونه به شرح زیر است:

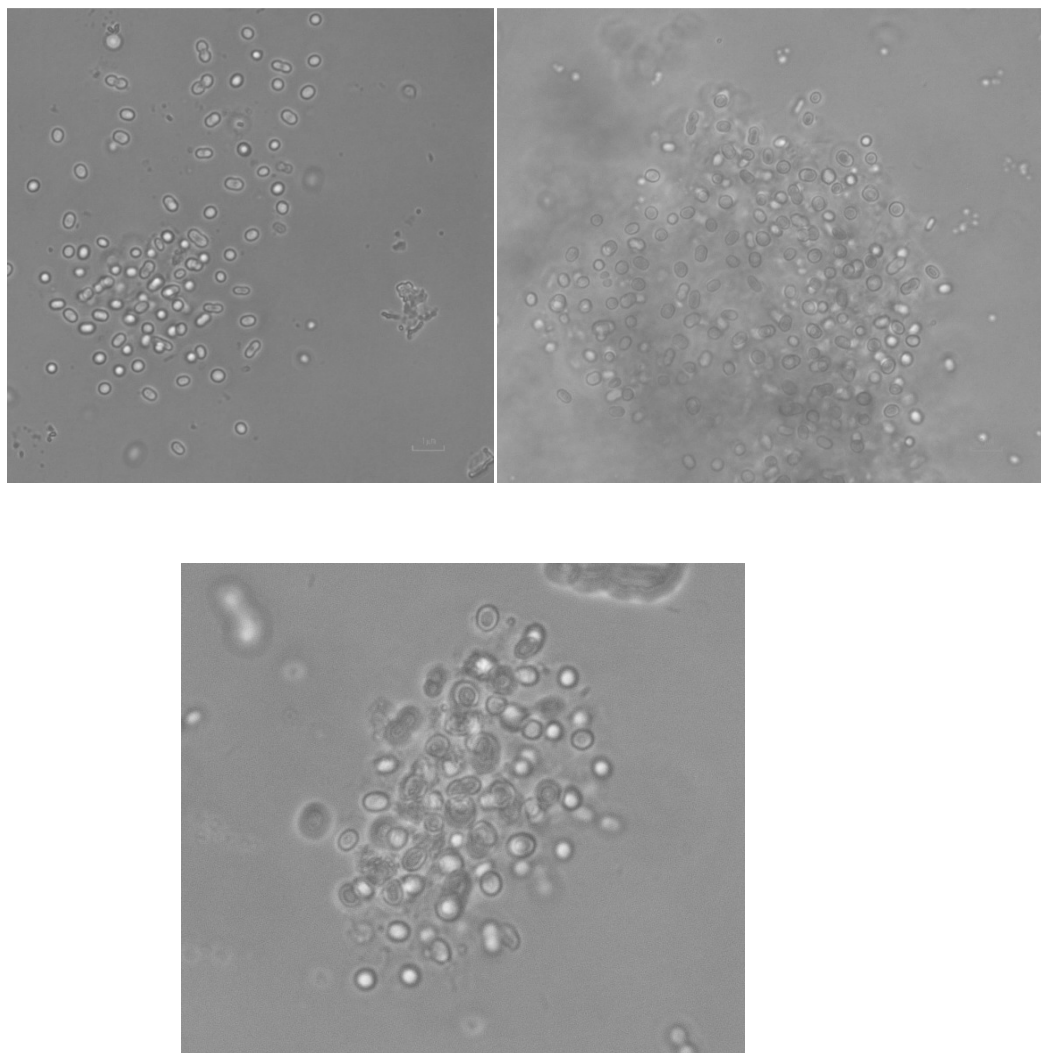
Phylum: Cyanobacteria Stanier ex Cavalier Smith
Class: Cyanophyceae Schaffner
Order: Synechococcales

نام استرین: CHPUN2

اندازه سلول: ۴.۷ - ۳.۲ میکرومتر

رنگ استرین: سبز

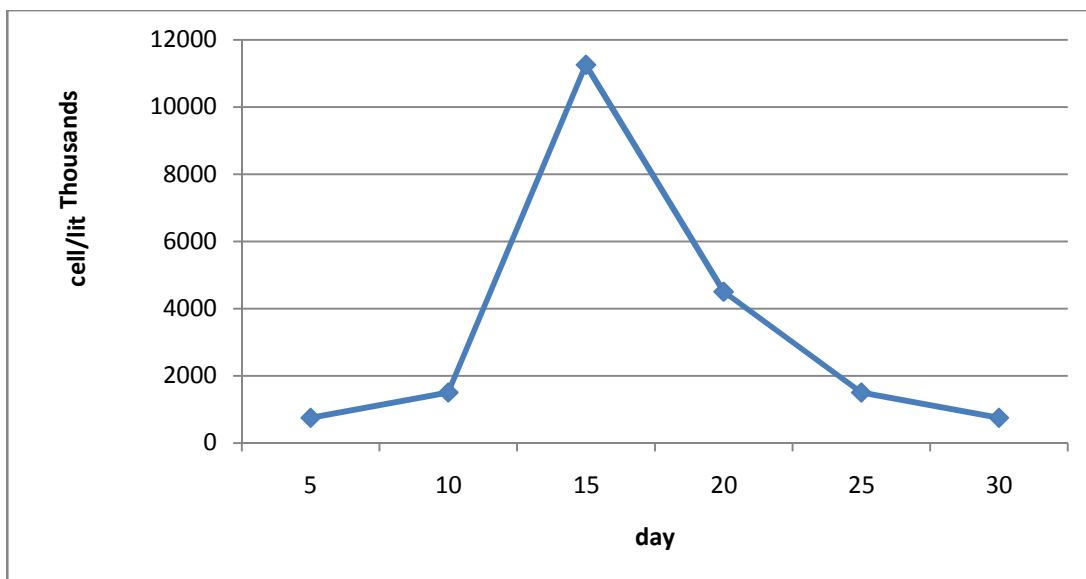
سلولها به رنگ سبز هستند و گرد تا بیضی می باشد سلولها به صورت انفرادی ، دوتایی و همینطور بیشتر به صورت دسته ای دیده می شوند. اطراف دسته سلولها که به شکل نامنظم هستند را لایه موسیلاژ گرفته است. اندازه سلولها بسیار کوچک هستند به طوریکه به راحتی با تکیه بر مورفولوژی قابل شناسایی نمی باشد ولی شکل کلی سلول و اندازه کوچک آن را در رده سیانو فیسه قرار می دهد (شکل ۸۶)



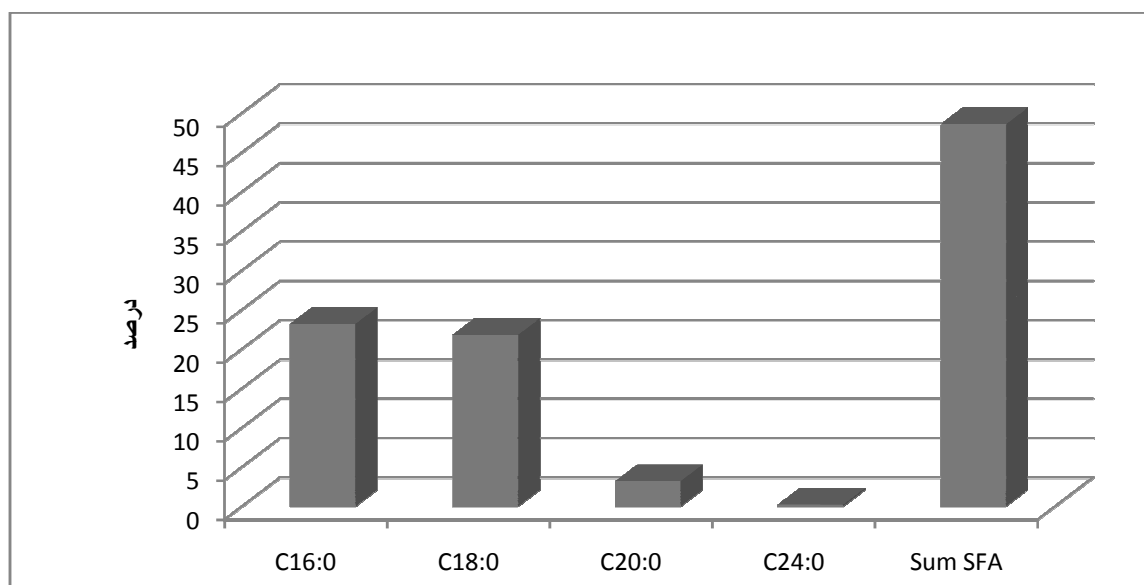
شکل ۸۶: سه شکل بالا استرین CHPUN2 از سیانوفیسه ها جدا سازی و خالص شده از سواحل چابهار

ب) رشد نسبی

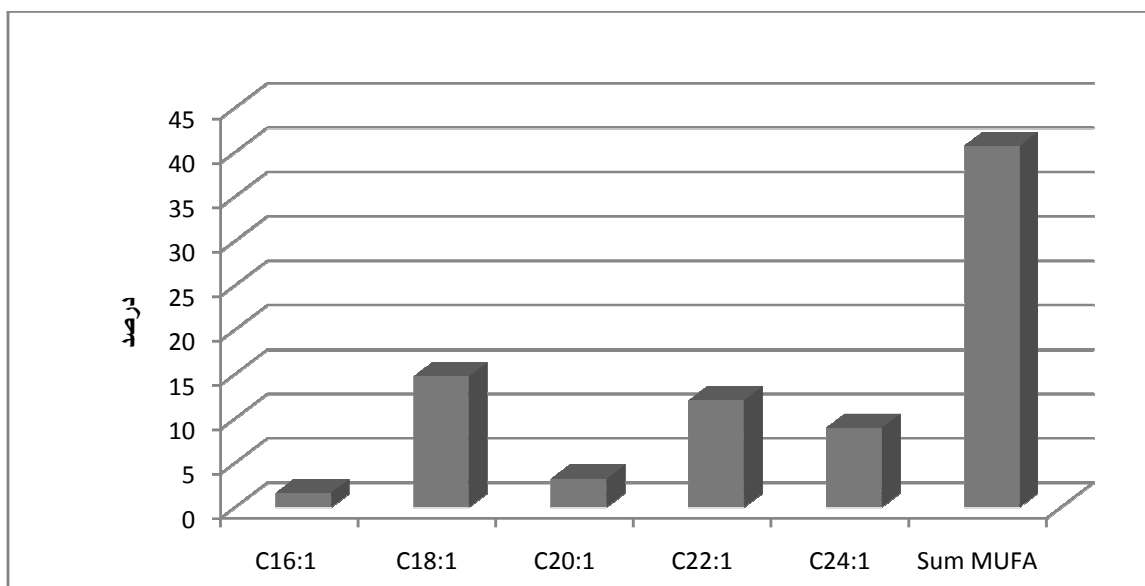
شکل ۸۷ رشد نسبی گونه ناشناس ۲ را نشان می دهد گونه در انتهای هفته دوم به ۱۰ برابر میزان روز اول رسیده و از رشد نسبی نسبتاً خوبی برخوردار است . بعد از روز ۱۵ گونه وارد فاز ثابت رشد شده و از روز ۲۰ به بعد وارد فاز مرگ می شود.



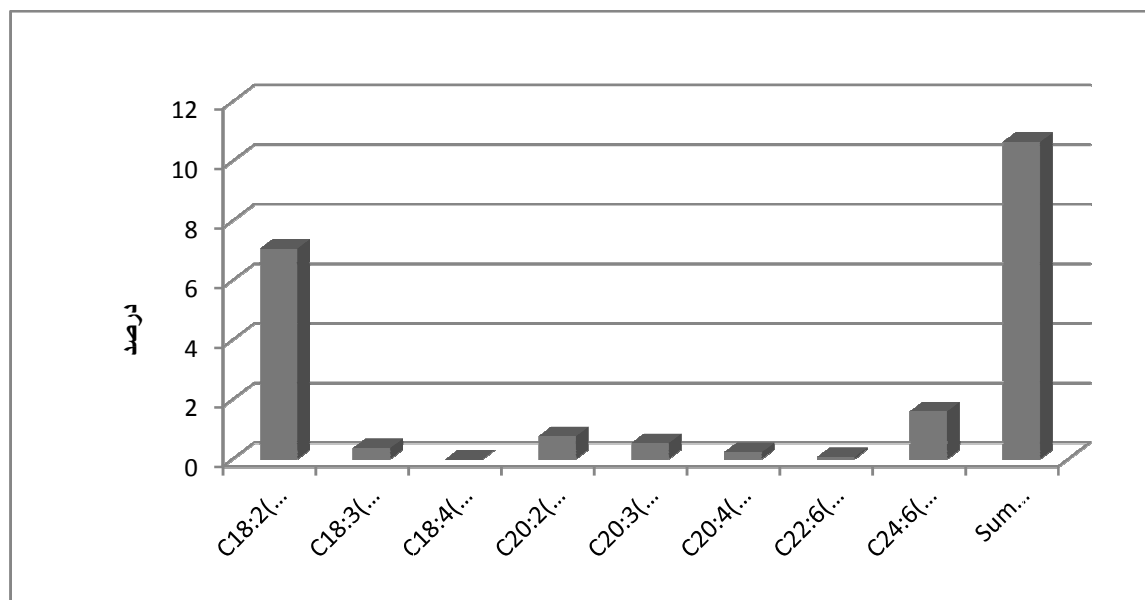
شکل ۸۷: رشد نسبی گونه ناشناخته ۲ طی ۳۰ روز بررسی



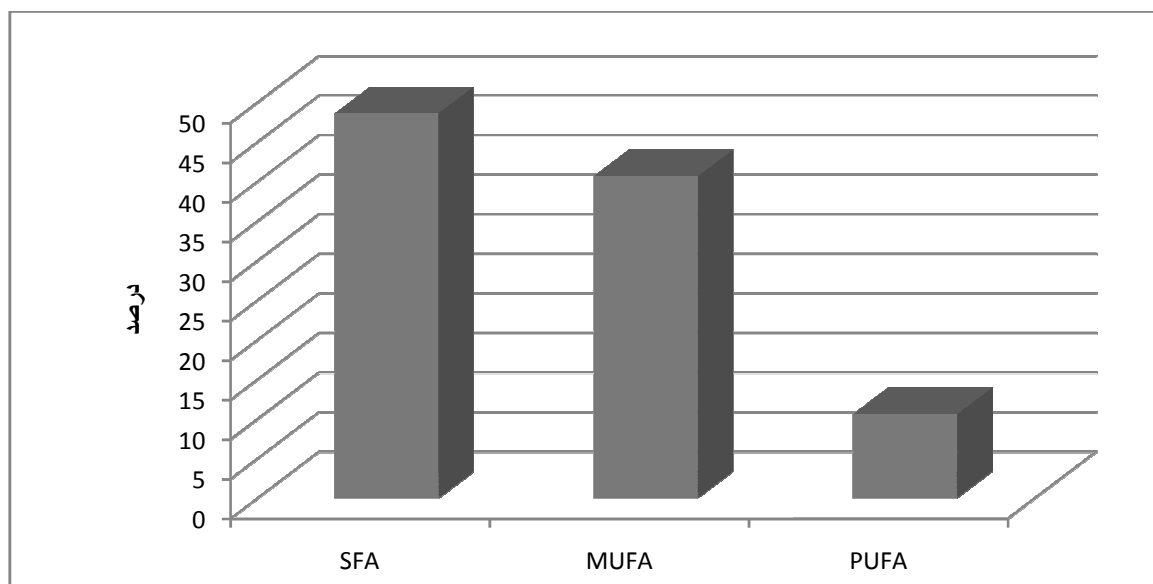
شکل ۸۸: انواع اسیدهای چرب اشباع شده ایزوله CHPUN2 از سیانوفیسه ها جدا و خالص شده از سواحل چابهار



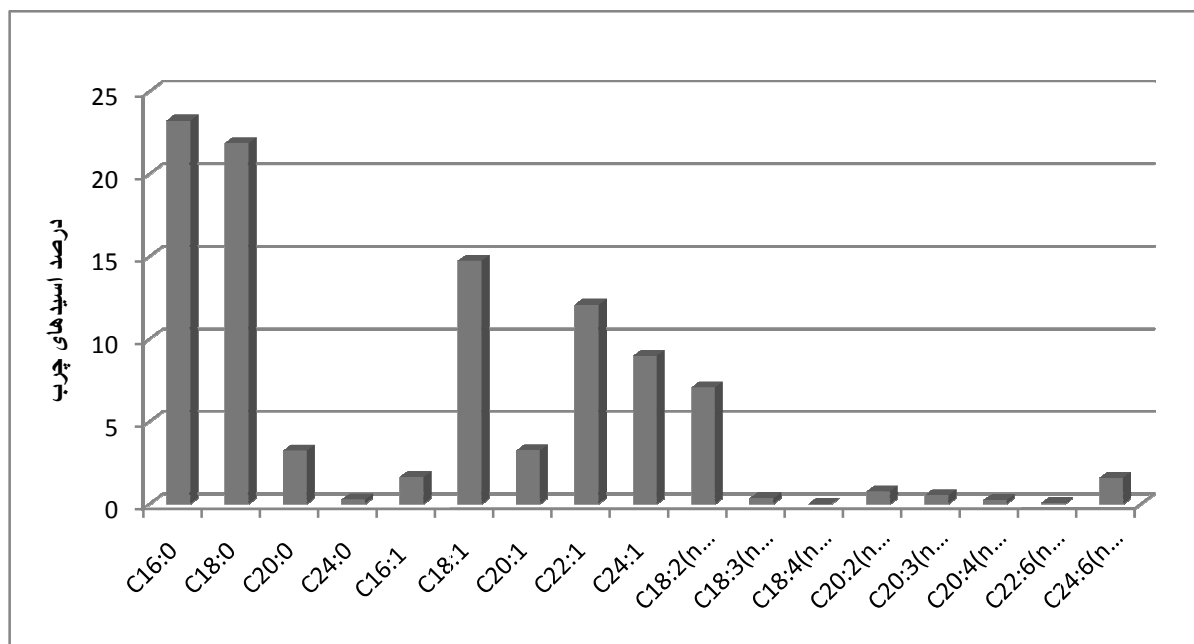
شکل ۸۹: انواع اسیدهای چرب اشباع نشده با یک پیوند دو گانه درایزوله CHPUN2 از سیانوفیسه ها جدا و خالص شده از سواحل چابهار



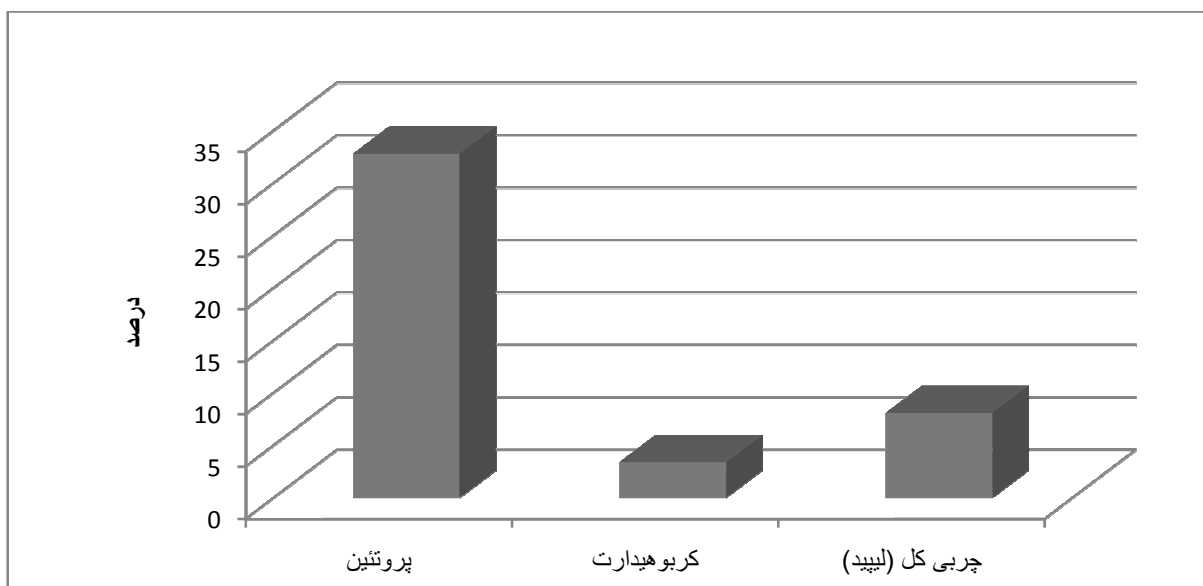
شکل ۹۰: انواع اسیدهای چرب اشباع نشده با چند پیوند دو گانه درایزوله CHPUN2 از سیانوفیسه ها جدا و خالص شده از سواحل چابهار



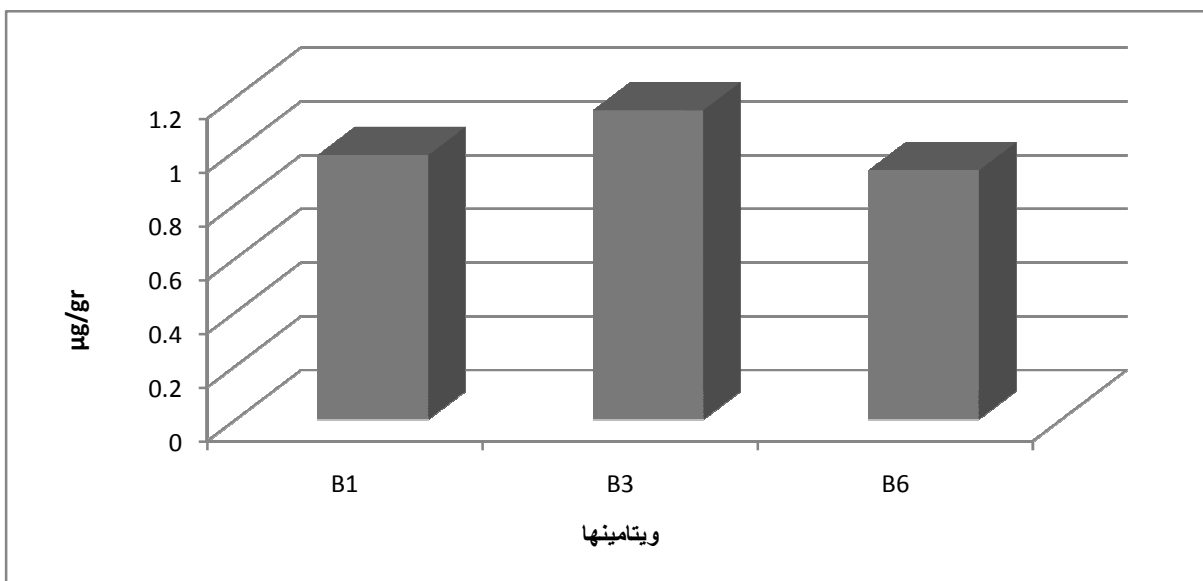
شکل ۹۱: مقایسه درصد سه دسته از اسیدهای چرب در ایزوله ناشناخته جدا شده از سواحل سیستان و بلوچستان



شکل ۹۲: پرو فیل اسیدها چرب در ایزوله CHPUN2 از سیانوفیسه ها جدا و خالص شده از سواحل سیستان و بلوچستان



شکل ۹۳: درصد لیپید، پروتئین و کربوهیدرات در ایزوله CH-PUN2 از سیانوفیسه ها جدا و خالص شده از سواحل چابهار



شکل ۹۴: مقایسه میزان برخی از ویتامینهای محلول در آب در ایزوله CH-PUN2 از سیانوفیسه ها جدا و خالص شده از سواحل سیستان و بلوچستان

۴- بحث و نتیجه گیری

امروزه استفاده از میکروالگها در تحقیقات بیوتکنولوژی در سراسر دنیا از جایگاه خاصی برخوردار است. علاوه بر این نانوفیتوپلانکتونها (اندازه ۲۰-۲ میکرومتر) از اجزای اصلی و بسیار مهم در زنجیره غذایی هستند و نقش اساسی در تغذیه زئوپلانکتونها و مراحل لاروی بسیاری از آبزیان مانند نرمتنان، ماهی و میگو و دارند. میکروالگها از نظر زیست محیطی هم بسیار حائز اهمیت هستند. با وجود اهمیت بالای آنها جدا سازی و خالص سازی و شناسایی دقیق این ریز جلبکها کاری بسیار دشوار است.

در حال حاضر حدود ۴۰ میکروالگ از اعضای خانواده باسیلاریوفیسه، پارسینوفیتا، کلروفیسه، یوماستیگو فیتا و کریپتوفیتا از نواحی معتدله آبهای دریایی سراسر دنیا جدا شده و در آبرزی پروری دریایی استفاده می شود (Volkman et al. 1989, Brown et al. 1997, Becker 2004, Muler-Feuga 2004). گونه های کمتری از نواحی تروپیکال و ساب تروپیکال آبهای دریایی دنیا جدا و به عنوان گونه های مناسب آبرزی پروری دریایی (Mariculture) معرفی گردیده است (Vankata et al. 2005).

بر اساس نتایج پروژه حاضر ۲۵ گونه از میکروالگها برای اولین بار از آبهای ساحلی جنوب شرقی ایران از سواحل چابهار جدا سازی و خالص گردید. در ایران مطالعات اندکی در خصوص جدا سازی میکروالگها با هدف استفاده در آبرزی پروری صورت گرفته است. گونه ای از اسکلتونما برای اولین بار از آبهای ساحلی خلیج فارس از سواحل بوشهر جدا گردید (منبع). *Dunaliella salina* از مرداب گاو خونی اصفهان جدا سازی و خالص گردید و روند رشد سلول در اثر کمبود سلفور بررسی گردیده است (آقای و شریعتی، ۱۳۸۶). وانکاتا و همکاران در سال ۲۰۰۵ از خلیج کویت (Kuwait bay) و خلیج عربی (Arabian Gulf) برای اولین بار دو گونه از میکروالگها متعلق به دیاتومه ها (*Nitzschia frustula*) و جلبکهای سبز (*Clamydomonas plethora*) را

از آبهای دریایی تروپیکال با هدف توسعه آبرزی پروری دریایی مناطق تروپیکال جدا سازی و خالص نمودند. از جنگلهای مانگرو خلیج فارس چهار استرین میکروالگها که دو استرین آن متعلق به نانوکلوپسیس (*Nannochloropsis sp*) یک استرین کلرلا (*Chlorella sp*) و یک استرین نیتسچیا (*Nitzschia sp*) د با هدف کاربرد آنها به عنوان بیودیزل مورد ارزیابی و شناسایی قرار گرفت (Moazami et al. 2011). از آبهای تروپیکال استرالیا ۱۰ استرین میکروآلگ با هدف تعیین اسیدهای چرب و پتانسیل استفاده در آبرزی پروری جدا سازی و خالص گردید. (Renaud et al. 1999).

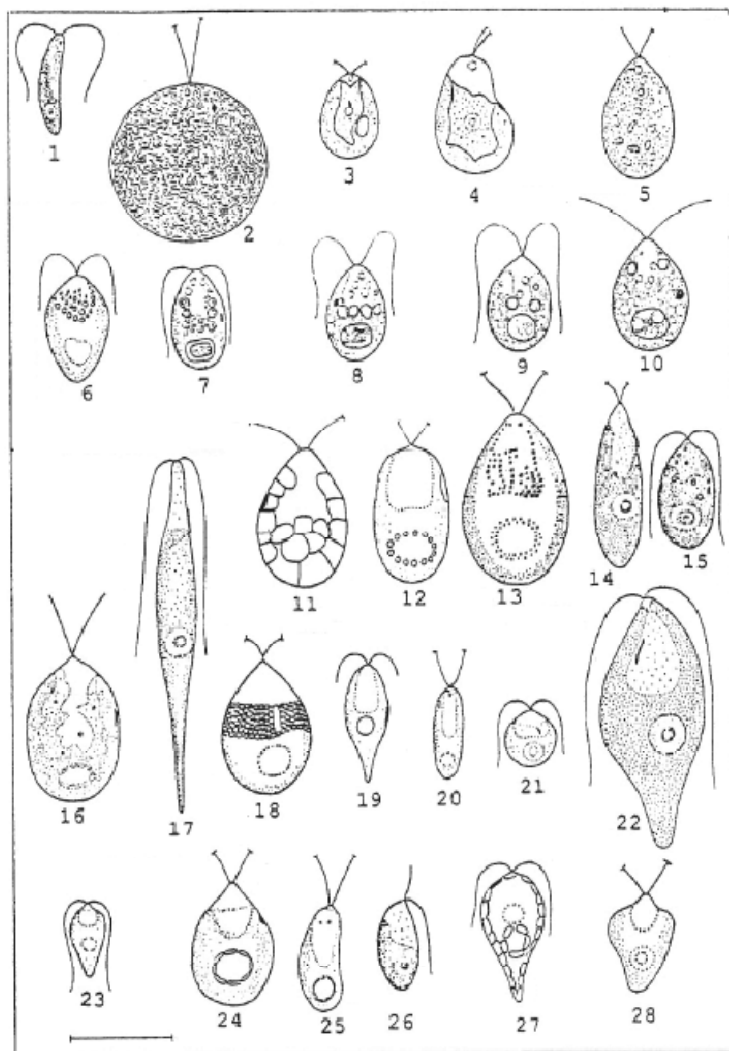
یک گونه از ارکرومونا (*Ochromonas sp.*) از آبهای ساحلی در انگلیس جدا سازی و ارزش غذایی آن مورد ارزیابی قرار گرفت (Pringsheim 1952). Renaud et al. در سال ۱۹۹۴ از آبهای ساحلی شمال استرالیا ۱۲ میکرو آلگ راجدا سازی کردند و به منظور استفاده در آبرزی پروری در مناطق تروپیکال ترکیبات اسیدهای چرب و شیمیایی آنها را بررسی کردند. Zhou و همکاران در سال ۱۹۹۰ از آبهای ساحلی شانگ دانگ برای اولین بار *Isochrysis galbana* را جدا سازی و خالص کردند. میکرو آلگهای نانوپلانکتونی از شرق دریای Ionian Sea در یونان جدا سازی گردید و برای استفاده در آبرزی پروری (Mariculture) بررسی گردیدند (Tezovenis et al., 2009)، درآین مطالعه آنها موفق به جدا سازی ۵ ایزوله از تتراسلمیس و یک ایزوله از *Pyramimonas* گردیدند. از آبهای ساحلی شمال برزیل سه گونه ریز جلبک متعلق به گونه های *Cylindrotheca* *closterium*, *Tetraselmis gracilis*, *Caetoceros gracilis* جدا سازی و خالص گردید و ترکیبات شیمیایی آنها به منظور پتانسیل استفاده در آبرزی پروری (Mariculture) مورد ارزیابی قرار گرفتند (Junior et al., 2007). گونه های دونالیا از دریاچه ای هیپرسالین در ترکیه جدا و خالص سازی گردید (Kacka and Donmez, 2008).

تمام این مطالعاتی که در بالابه آنها اشاره گردید، فقط از جنبه نشان دادن اهمیت جدا سازی گونه های بومی از آبهای ساحلی و همینطور گونه هایی که در آبرزی پروری دریایی دارای پتانسیل هستند به موضوع پرداخته شده است. بعد از جدا سازی گونه ها و خالص کردن آنها مرحله مهم درنتایج پروژه حاضر شناسایی استرینهای خالص شده بود که همانطور که در قسمت نتایج اشاره گردید بر اساس ریخت شناسی گونه و آنالیزهای مولکولی در این تحقیق انجام شد. بسیاری از میکرو الگها به دلیل خصوصیات مورفولوژی بسیار ساده شناسایی بر اساس ریخت شناسی بسیار مشکل و بیشتر مواقع غیر ممکن است . (Karlson et al., 1996; Santos, 1996; Andersen et al., 1998)

در این صورت ریژ گیهای مولکولی گونه برای شناسایی باید استفاده گردد (Andersen et al., 1998; Krienitz et al., 2000).

مولکولهای ریبوزومی rRNA از نشانگر های مولکولی بسیار مناسب در مطالعات مولکولی محسوب می شوند زیرا دارای مناطق بسیار حفاظت شده هستند (Hicks et al., 1992; Caron et al., 1991).

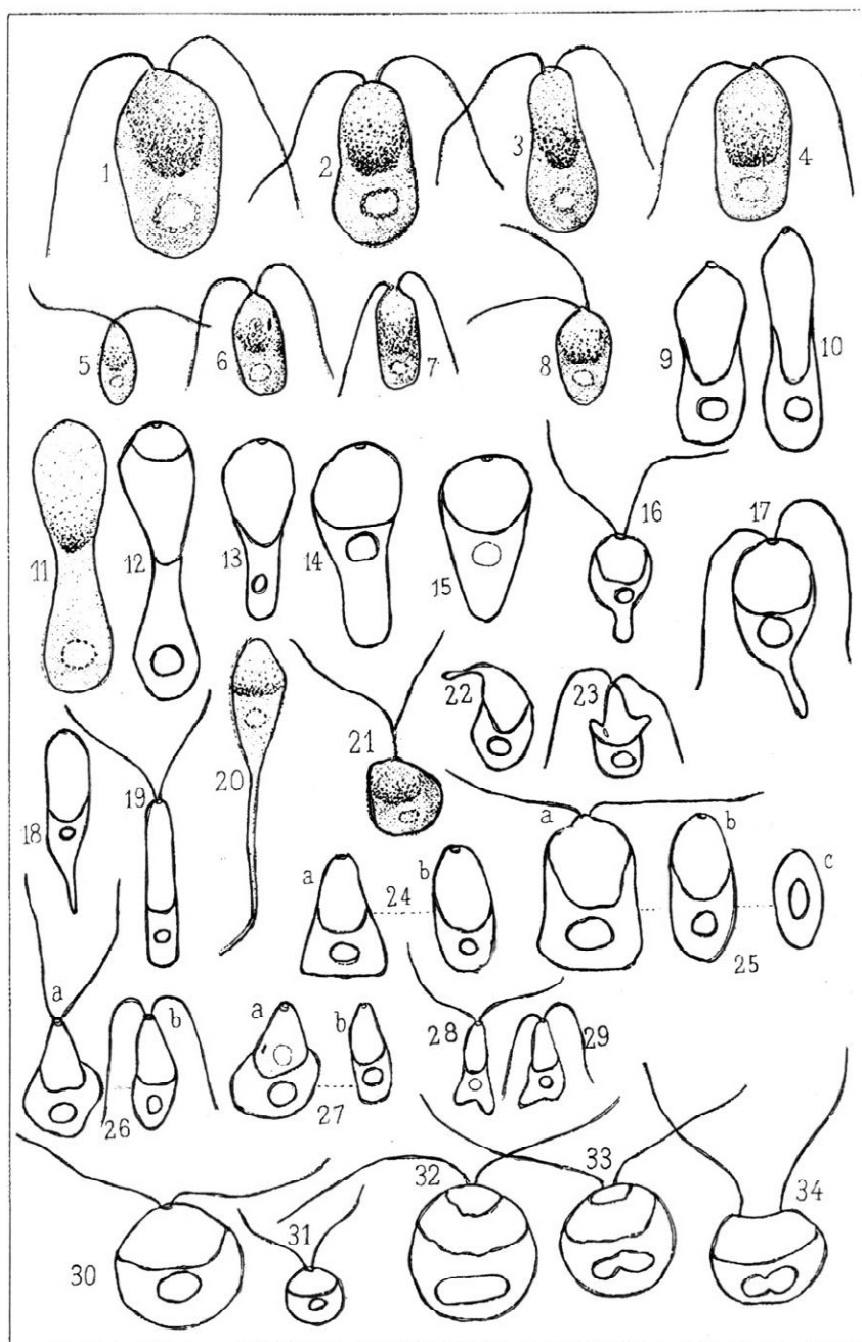
یکی از مهمترین گونه هایی که در پروژه حاضر برای اولین با از آبهای دریایی جنوب شرقی ایران جدا سازی و خالص گردید، گونه *D. cf. bardawil* است این یکی از گونه هایی است که در سطح جنس شناسایی آن امکان پذیر می باشد: به خاطر اندازه بزرگتر سلول (۷-۱۲ میکرومتر)، شکل کلی سلول که به فرمهای گرد، بیضی و اشکی شکل است و رنگ قرمز آن درشوری بالا و تغییر رنگی که در شوریه های پایین میدهد. اما در حد گونه به راحتی با گونه های مشابه در این جنس اشتباه می شود (شکل ۹۵) و حتی یک گونه در شرایط مختلف در محیط کشت تغییر شکل می دهند (شکل ۹۶) (Tempesta et al., 2010).



شکل ۹۵: مقایسه مورفولوژی انواع گونه های جنس دونالیا

۱. *D. acidophila*; 2. *D. flagellata*; 3. *D. lateralis*; 4. *D. obliqua*; 5. *D. paupera*, 6. *D. maritima*, 7. *D. polymorpha*, 8. *D. primolecta*, 9. *D. quartolecta*, 10. *D. tertiolecta*, 11. *D. parva*, 12. *D. pseudosalina*, 13. *D. salina*, 14. *D. baas-beckingii*, 15. *D. bioculata*, 16. *D. carpatica*, 17. *D. gracilis*, 18. *D. granulata*, 19. *D. media*, 20. *D. minuta*, 21. *D. minutissima*, 22. *D. ruineniana*, 23. *D. terricola*, 24. *D. viridis*, 25. *D. asymmetrica*, 26. *D. jacobae*, 27. *D. peircei*, 28. *D. turcomanica*. Scale bar: 10 μ m

(اقتباس از اورون و بناموتز ۱۹۹۲)



شکل ۹۶: سلولهای قرمز دونالیا سالینا (۱-۴)، سلولهای سبز *D. viridis* (۵-۸)، تنوع شکلی در یک قطره به تدریج آب آن تبخیر می شود (۹-۲۹)، شکلهای کروی در پروسه رقیق سازی (۳۰-۳۱) و شروع تقسیم سلولی در این گونه (۳۲-۳۴) (اقتباس از Teodoresco 1905)

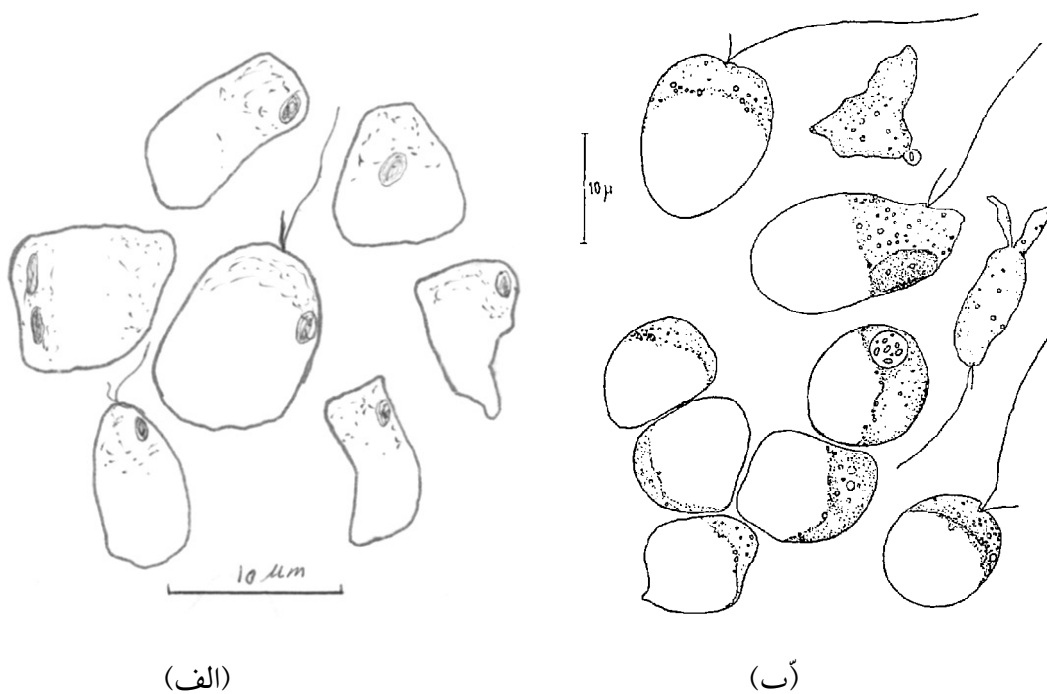
همانطور که در شکل‌های بالا قابل مشاهده است با توجه به پلی مورف بودن و توانایی سازش به تغییرات محیطی گونه های این جنس شناسایی گونه ای را مبهم کرده است (Oren, 2005; Tempesta et al. 2010). راجا و همکاران با استفاده از پرایمرهای تخصصی توانستند گونه دونالیا سالینا را شناسایی کنند (Raja et al., 2006). همانطور که در نتایج نشان داده شد دو استرین دونالیا که در این پروژه خالص گردید و توالی ژنی آنها بررسی گردید نشان داد که با ۹۶ درصد حمایت یک گونه هستند و هر نزدیکترین خویشاوند آنها گونه باردویل می باشد. توالی نوکلئوتیدی منطقه ژنی مورد بررسی rDNA-LSU در این تحقیق نشان داد که تشابه بسیار نزدیک استرین های مختلف را نشان می دهد به طوریکه ۱۵ استرین با ۸۶ درصد بوت استرپ حمایت در یک کلاد قرار می گیرند. توالی نوکلئوتیدی منطقه ITS در استرین های مختلف دونالیا در سواحل رم تشابه ژنتیکی بسیار نزدیک با ۸۴-۹۶ درصد حمایت بوت استرپ را نشان دادند (Tempesta et al. 2010). در عین حال بسیاری از مطالعات نشان می دهد که تغییرات شرایط اکولوژیکی و فیزیولوژیکی استرینهای مختلف اغلب گونه ها تنوع ژنتیکی استرین های مختلف یک گونه را سبب می شود (Bolch et al. 1999; Gómez and González 2001). بررسی توالی ژنی در ناحیه در دو استرین دونالیا سالینا جدا شده از آبهای ساحلی شیلی طوریکه انتظار می رفت به خاطر موقعیت جغرافیایی مشابه در یک گروه قرار نگرفتند در حالیکه با استرین های مختلف این گونه از دیگر نواحی جغرافیایی مانند ایزوله های اسرائیلی و مکزیک در یک گروه قرار گرفتند (Gómez and González 2004). به نظر می رسد که قرار گرفتن دو استرین ایرانی در یک گروه در آنالیزهایی که در قسمت نتایج این پروژه نشان داده شد به دلیل جدا سازی آنها از موقعیت جغرافیایی مشابه نمی باشد و اینکه هر دو استرین ۹۶ درصد بوت استرپ حمایت می شوند و از ۱۰۰ درصد حمایت برخوردار

نیستند می تواند به دلیل تفاوت شرایط محیطی مانند تفاوت در شدت نور دریافتی یا احتمالا تغییر در محیط کشت و غیره باشد. در عین حال دو ایزوله ایرانی نزدیکترین شباهت توالی ژنی را در ناحیه مورد بررسی به گونه بارداویل دارد.

بر اساس نتایج گونه *Ochromonas* sp. جدا شده از سواحل ایران متعلق به رده کریزوفیسه ها است یکی از بزرگترین جنسهای این رده با بیش از ۷۰ گونه (Hibberd 1970; Anderson 2011) دارای سلولهای طلائی و قهوه ای و تنوع شکلی هستند. گونه ایرانی دارای انواع شکلهای کروی، بیضی، تخم مرغی، گاهی مثلثی و گاهی اشکال نامنظم می باشد به خاطر تنوع شکلی در برخی از گونه های این جنس شناسایی گونه ای با مشکل مواجه می شود. مقایسه مورفولوژی سلول (cell outline) ایزوله های ایرانی را که در قسمت نتایج آورده شده است و شکل شماتیکی که بر اساس خطوط خارجی سلول رسم شده است شکل (۹۷ الف) با شکل شماتیک *Ochromonas malhamensis* (شکل ۹۷ ب) نشان میدهد سلول ایرانی بسیار نزدیک به گونه فوق می باشد در عین حال اگر با اشکال متفاوت این جنس که در شکل (۹۸) آورده شده است (Hall 1953) مقایسه کنیم، می تواند با گونه های دیگر از جمله اکرومناس گرانولاریس هم شبیه باشد. بنا بر این نمی توان تنها با تکیه بر میکروسکوپ نوری گونه دقیق آنرا مشخص نمود. گونه جدیدی به نام *Ochromonas moestrupii* اخیرا از آبهای ساحلی استرالیا جدا گردیده و شناسایی شده است، این گونه هم دارای شکلهای متنوع از جمله تخم مرغی شکل نیزه ای، گلابی، کروی و به ندرت مثلثی می باشد و اندازه آن کوچکتر (۵-۹ میکرومتر طول) از استرین های ایرانی می باشد. (Anderson 2011).

بررسی مولکولی گونه تک تک استرینها و هر سه استرین نشان داد که همه گونه های ایرانی متعلق به جنس اکرومناس می باشند. گزارشات زیادی در خصوص توالی ژنی این گونه جهت مقایسه وجودداشت از

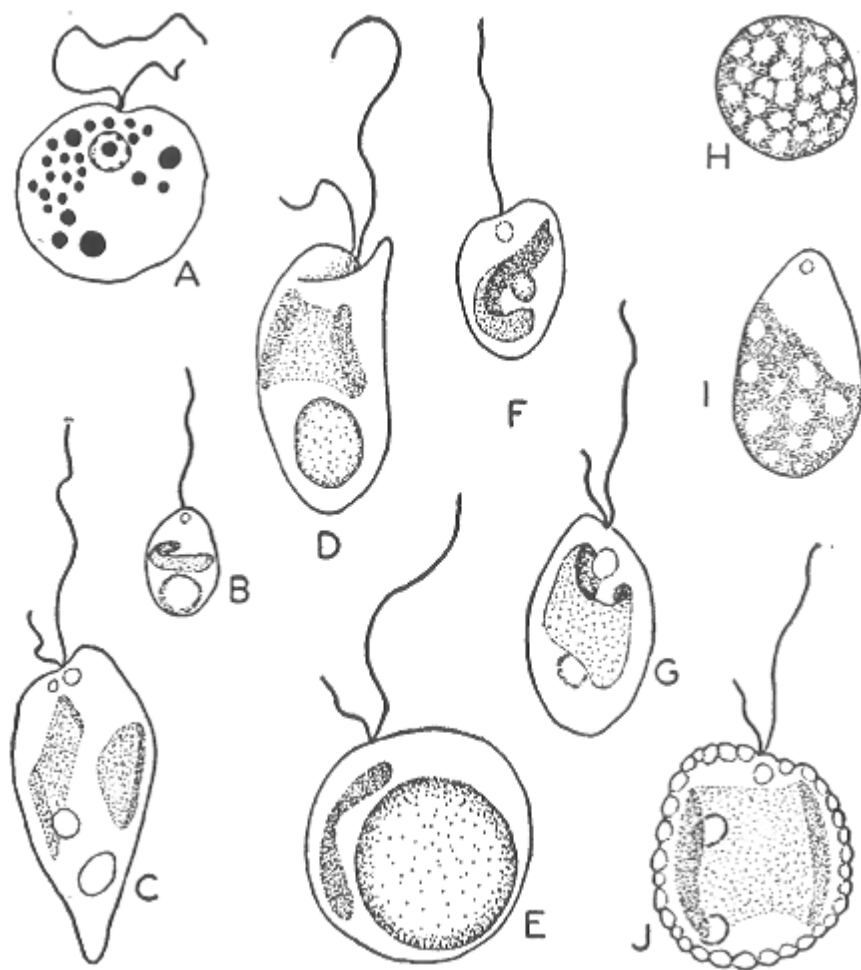
آنجائیکه اغلب گونه های این جنس هترو تروف هستند و نگهداری آنها در شرایط آزمایشگاهی سخت است مطالعات اندکی در خصوص گونه های مختلف این جنس صورت گرفته است (Hibberd 1970).



شکل ۹۷: الف: شکل شماتیک *Ochromonas sp.* استرین های ایرانی (ب) شکل شماتیک گونه *Ochromonas malhamensis*

درختهای فیلوژنی که در قسمت نتایج بای این گونه آورده شده است نشان داد که هر سه استرین ایرانی با حمایت بالای بوت استرپ (>۹۶٪) با گونه *Ochromonas sp.* ایزوله HFCC75 و ۱۰۰ درصد حمایت بوت استرپ با گونه *Poterioochromonas malhamensis* در یک کلاد قرار می گیرند پس نزدیکترین گونه از نظر توالی ژنی به گونه ایرانی می باشد. لازم به ذکر است که گونه *Ochromonas malhamensis* و گونه *Poterioochromonas malhamensis* یک گونه هستند که دارای دو نام مشابه هستند. همینطور خصوصیات

ریخت شناسی که در بالا توضیح داده شد می توان گفت گونه ایرانی یک واریتی از گونه *O. malhamensis* باشد ولی تا زمانی که اطلاعات مورفولوژی گونه با استفاده از میکروسکوپ الکترونی تکمیل نگردد همینطور اطلاعات بیشتری از این گونه از دیگر نقاط ساحلی دنیا وارد بانک ژن نشود با قطعیت نمی توان گفت که ایزوله ایرانی همان مالهامنسیس است. گونه دیگری که با ایزوله های ایرانی در یک کلادخواهری قرار میگیرد با بوتاستریضعیف ($> 50\%$) گونه *O. danica* است (شکلهای ۱۴-۱۵) که اطلاعات مورفولوژی هم نتایج مولکولی را تایید می کند گونه دانیکا کاملاً برگی شکل است و دارای *posterior tail* می باشد که این گونه را از بقیه گونه های جنس متمایز می کند (Bouck 1971).



شکل ۹۸: مقایسه مورفولوژی سلولی گونه های مختلف جنس اکرومونا و جنسهای مشابه (اقتباس

از Hall ۱۹۵۳)

A. *Ochromonas granularis*; B. *Chromulina annulata*; C. *O. reptans*; D-E. *O. granularis*; F. *C. commutate*; G. *O. sp*; H, I. *Chrysopsis sp*. J. *O. pinguis*

یکی دیگر از گونه هایی که در این پروژه خالص سازی گردید گونه آمفورا که به نام *A. cf cofaeformis* است

که درخصوص شناسایی گونه و شباهتهای فیلوژنتیکی آن مفصل در (عطاران و همکاران ۱۳۹۰) بحث شده

است.

گونه *Cylindrotheca closterium* که در این طرح خالص سازی گردید تا قبل از انجام آنالیزهای مولکولی به

عنوان گونه ای از جنس *Nitzschia* شناخته شده بود. تشخیص این گونه با میکروسکوپ از گونه *Nitzschia*

longissima بی نهایت دشوار است (Tao et al. 2007).

آنالیزهای مولکولی مشخص کرد که ایزوله ایرانی با بوت استرپ بسیار بالا با گونه سیلندرو تکا در یک

گروه قرار می گیرند و گونه هایی از نیتسچیا در کلاد خواهری آن قرار می گیرند. تائو و همکاران در سال

۲۰۰۷ واگرایی ژنتیکی دو گونه سیلندرو تکا و نیتسچیا را در ایزوله های چینی نشان دادند. کارهای مشابه et

(Sorhannus et al. 1997; Tao et al., 2007; Haito et al. 2006) و بررسی مولکولی که در این تحقیق صورت گرفت

نشان می دهد با وجود شباهت مورفولوژی بسیار نزدیک دو گونه اشاره شده از نظر توالی ژنی متفاوت هستند

این گونه از دیاتومه های مروپلانکتونیک بوده قسمتی از زندگی خود را در کف بسر می

برد. گونه *Cylindrotheca closteriu* از نظر بیوتکنولوژی بسیا با ارزش می باشد. این گونه توانایی ازاد کردن

کربوهیدرات و پلی ساکارید را به خارج از سلول در محیط کشت دارد.

(Urbani et al. 2005) و نقش مهمی در کاهش فسفر در زمان بلوم پلانکتونی دار دو کاهش نوترینتها که توسط

فاضلاب کارخانه ها وارد می شود می تواند نقش مهمی داشته باشد استفاده های صنعتی دیگری که از گونه

می شود در هچری آبالون برای ستل شدن لارو آنها استفاده می شود (Roberts et al., 2007; Kingston 2009).

در این تحقیق همچنین گونه ای از *Nitzschia* با مورفولوژی تقریبا مشابه سیلندرو تکا ولی سایز بزرگتر از

آبهای ساحلی چابهار جدا سازی گردید که در حد جنس شناسایی شد و اطلاعات مولکولی هم کمکی به

شناسایی گونه نکرد گونه در پایه کلادی قرار می گیرد که شامل *Nitzschia navis varginica* می باشد ولی از

این گونه هم دور است و با بوت استرپ ضعیف در (۶۵٪) پایه ان قرار می گیرد بنا بر این نمی توان گونه را به

گونه نویس نسبت د اد. به علاوی بررسی مورفولوژی گونه *N. navis var.* نشان می دهد که اگر استرین ایرانی را با مورفولوژی این گونه که در (2000 Lanholm and Moestrup) توضیح داده شده مقایسه کنیم متوجه اختلاف فاحش دو گونه می شویم گونه ایرانی در دو انتهای اپکس و انتاپکس بسیار باریک و نوک تیز شده درحالی که در گونه نویس در دو انتها باریک و گرد شده است (Landholm and moestrup 2000; Kotaki et al. 2000).

دو گونه از جنس کیتوسروس در این تحقیق شناسایی شد که با توجه به نتایج یک استرین که به صورت زنجیری است نزدیکترین خویشاوند از نظر توالی ژنی به گونه *C. lorenzianus* است که مقایسه مورفولوژی گونه با گونه های مشابه (Tabassum and Saifullah, 2010) اطلاعات مولکولی تایید می کند.

۱۷ گونه از کیتوسروس از شمال غرب دریای عربی از سواحل پاکستان شناسایی شده که استرین ایرانی که تشکیل زنجیر می دهد از نظر ریخت شناسی شبیه لورنزیانوس می باشد (Tabassum and Saifullah, 2010).

استرین دوم که به صورت تک سلولی است و تشکیل زنجیر نمی دهد بیشترین شباهت را از نظر طرز قرار گرفتن زوائد به گونه گراسیلیس دارد (Carmelo 1997) ولی اطلاعات مولکولی در منطقه ژنی مورد بررسی در این پروژه در بانک ژن محدود بوده و استرین ایرانی شناسایی در حد گونه آن میسر نگردید. بیشترین شباهت را به به گونه های *C. calcitrans*، *C. gracilis* و *C. mulleri* دارد و اگر با گونه های تکی مانند *C. simplex var* *calcitrans* می باشد (Carmelo 1997: plate47).

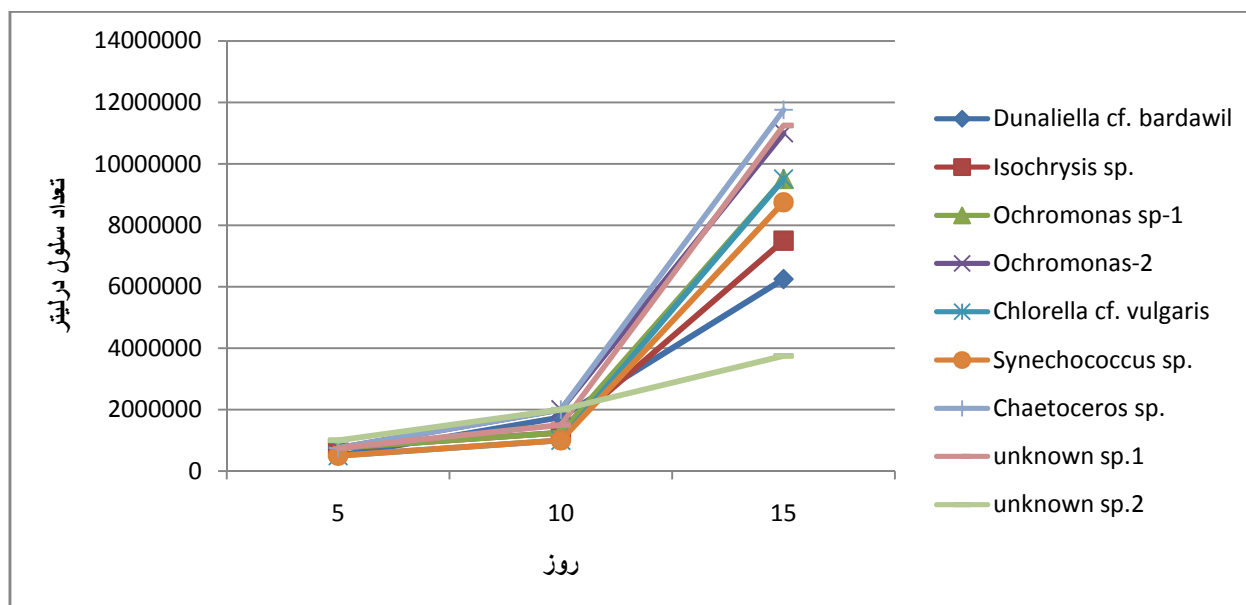
در عین حال برای تعیین قطعی گونه نیاز به تهیه عکسهای میکروسکوپ الکترونی می باشد.

Clorella cf. vulgaris یکی دیگر از گونه های مهمی که در این تحقیق خالص سازی و شناسایی گردید. این گونه یکی از مهمترین گونه های سبز است که تا قبل از شناسایی مولکولی گونه در این پروژه به عنوان گونه ای از جنس نانوکروپسیس شناخته می شد. Yu et al. در سال ۲۰۰۷ گونه ای از جلبکهای سبز را از

استخرهای پرورش میگو در چین جدا سازی کردند و آنرا به عنوان گونه ای از *Nannochloropsis* شناسایی کردند ولی بررسی توالی ژنی گونه جدا شده بر اساس 18s rDNA نشان داد که گونه *Chlorella* می باشد . نانوکلوپسیس متعلق به یوماستیگو فیه ها مطالعات مختلف نشان داد که گروه مونوفایل هستند و کلرولا از نظر توالی ژنی کاملاً با این گروه مونوفیلی تفاوت دارد (Anderson et al., 1998). در آنالیز مولکولی که در این پروژه انجام شد دو استرین که تحت شرایط متفاوت جدا سازی و نگه داری شدند هر دو ایزوله متعلق به کلورلا ولگارس بود و در هیچیک از دو استرین نانوکلوپسیس که یک گروه مونوفایل است با گونه های ایرانی ارتباط خویشاوندی نشان ندادند. نتیجه ای که از آنالیز مولکولی این پروژه با مطالعات قبلی که در خصوص فیلوژنی این گونه ها انجام شده موافق می باشد (Hus & song 1990; Anderson et al. 1998; Yu et al. 2007; Li et al., 2011; Bock et al. 2011; Kerienitz et al., 2010) گونه *Synechococcus* sp در پروژه حاضر بر اساس موفولوژی کلی سلول که سلولها به صورت میله ای و کوکوئید (Bilgram and Saha 2002) و اندازه و رنگ استرین شناسایی گردید. اندازه ای که در منابع مختلف برای این گونه ذکر می شود ۳-۱ میکرومتر می باشد و (Robertson et al. 2001; Holt et al. 1994). در بعضی منابع استرین های مختلف سینوکوکوس را به دلیل ساختار مورفولوژی بسیار ساده و عدم امکان شناسایی گونه ای به نام "culture group" می شناسند (Honda et al., 1999; Rippka et al., 1979). دو گونه در این تحقیق به دلیل ساینز بسیار ریز آنها عدم تشخیص در حد جنس بر اساس اطلاعات موفولوژیکی ناشناخته باقی ماندند و نیاز به بررسی مجدد مولکولی دارند.

میکروالگهائی که پتانسیل استفاده به عنوان غذای زنده در ابزی پروری را دارند باید دارای خصوصیات و ویژگیهایی باشند تا بتوان آنها را به عنوان غذای مناسب معرفی نمود. این گونه های بایستی از نظر اندازه

مناسب باشند انهایی به عنوان غذای موجودات فیلتر فید استفاده می شوند بایستی سایز آنها بی ۱۵-۱ میکرون باشند و انهایی که به عنوان غذا برای چرنده ها استفاده می شوند اندازه آنها می تواند بین ۱۰۰-۱۰ میکرون باشد (Jeffrey et al., 1992; Kawamura et al., 1988) ویژه ای باشند. استرینهای خالص شده در این پروژه که به حجم بالا رسیدند با توجه به نتایج همه دارای سایز مناسب $15 >$ میکرون هستند و بعضی گونه ها که دارای اندازه بزرگتر هستند مانند نیتسچیا و سیلندرو تکا و آمفورا دارای پتانسیل استفاده برای لارو سخت پوستان و جونیل آبالون را دارای هستند (Brown and Robert 2002; Wikfors and Ohno 2001). میکروالگها همچنین باید دارای رشد مناسب و توانایی تحمل تغییرات اندک در شرایط آزمایشگاهی را داشته باشند و با تغییرات دمایی و شرایط نوری به اسانی از بین نروند که گونه های چابهار که به حجم انبوه رسیدند و در این پروژه به آنها در قسمت نتایج اشاره شد، نشان دادند که اولاً از رشد مناسب برخوردار هستند ثانیاً به مدت بیش از دو سال تحت تغییرات جزئی متغیرهای نوری و درجه حرارت فایکولب مرکز تحقیقات شیلات چابهار دوام آورده و از بین نرفتند، که مبین این است که اینها گونه های مقاوم به تغییرات محیطی هستند و بسیار مناسب جهت استفاده در آیزی پروری هستند. مقایسه رشد نسبی ایزوله های جدا شده در این پروژه در شکل ۹۹ آورده شده است. با توجه به نمودار در بین گونه ها کیتوسروس درای بیشتری میزان رشد و گونه ناشناخته ۳ درای کمترین میزان رشد بودند. ایزوله دوم اکروموناس هم از رشد نسبی خوبی برخوردار بود. تحت شرایط متفاوت در شرایط آزمایشگاهی رشد نسبی میکروالگها متفاوت خواهد بود (Sournia (1978) نوع محیط کشتی که استفاده می شود می تواند رشد را تحت تاثیر قرار دهد ایزو کرایسیس غالباً در محیط کشت کانوی رشد بیشتری رانسبت به محیط کشت تمل طی ۱۰ روز بررسی نشان داد در حالی که گونه تراسلمیس چویی در محیط کشت تمل رشد نسبی بیشتری را نشان داد (Kain 1960).



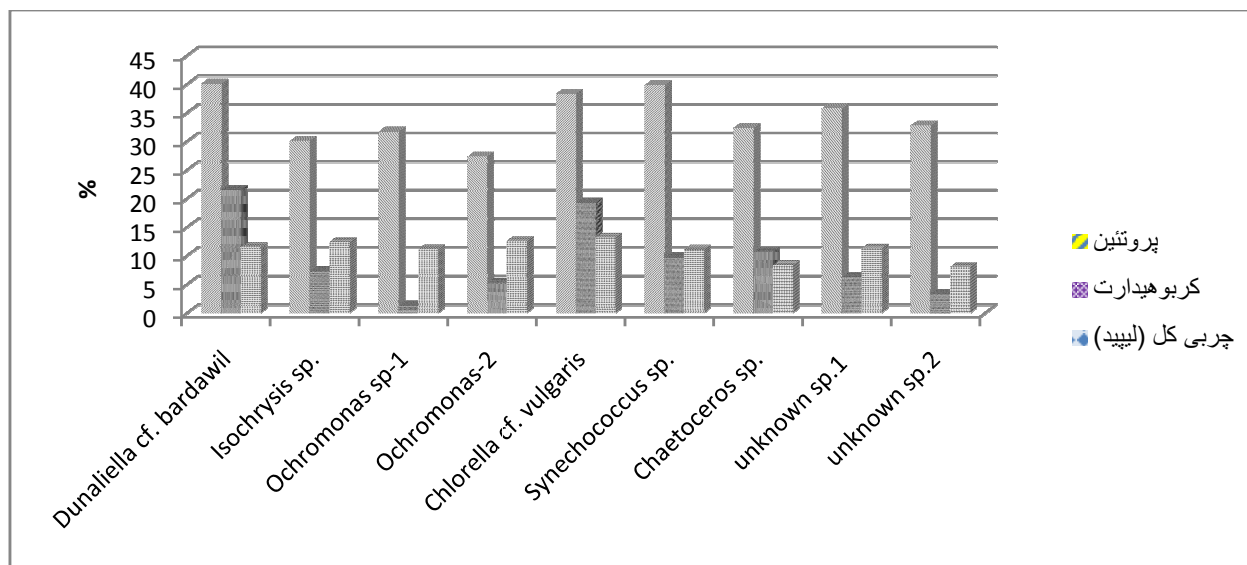
شکل ۹۹: مقایسه رشد مرحله لگاریتمی گونه های خالص شده و به حجم بالا رسیده در این پروژه

هوادهی و استفاده از دی اکسید کربن هم می تواند بر روی روند رشد میکروالگها تاثیر می گذارد استفاده از این دو حالت بر روی روند رشد نانوکلوپسیس نشان داد که استفاده از دی اکسید کربن تاثیر مثبت تری بر روی رشد داشته است (Chiu 2008; Gao & Ai 2004). گونه I. aff. Galbana در محیط رشد F2 بعد از ۸ روز تا ۶ برابر روز ۱ افزایش نشان داد (Valenzuela-Espinoza et al., 2002). روند رشد میکرو آلگها و اینکه آیا برای استفاده در تکثیر و پرورش مقرون به صرف هستند و یا از رشد کافی در مدت کوتاه برخوردار هستند یا نه با توجه به بحث های بالا به نظر می رسد که رشد یک گونه را می توان در شرایط آزمایشگاهی تعدیل کرد با استفاده از تعدیل نوری، درجه حرارت، میزان نوترینتها و نوع هوادهی و استفاده از محیط کشت های مختلف

(Laws et al., 1995; Bodger et al. 1994; Winters 1976)

ترکیبات بیوشیمیایی ریز جلبکها هم بین گونه های مختلف و تحت شرایط کشت مرحله رشد ترکیبات محیط کشت و فاکتورهای غیر زیستی مانند نور و درجه حرارت متفاوت است (Loourenco et al. 2002;)

(Renaud et al., 2002; Valenzuela et al., 2002) میکروالگها اگر در شرایط لگاریتمی رشد برداشت شوند و مورد ارزیابی پتانسیل غذایی قرار بگیرند معمولا دارای ۳۰-۴۰٪ پروتئین، ۱۰-۲۰٪ لیپید و ۵-۱۰٪ کربوهیدرات هستند (Renaud et al., 1999; Brown et al., 1997) و لی اگر وارد مرحله ثابت رشد شوند میزان آنها به مقدار قابل توجهی متفاوت خواهد بود (Harrison 1990). در مورد استرینهای چابهای برداشت میکروالگها به منظور ارزیابی پتانسیل غذایی تا قبل از روز ۱۴ رشد بود. میزان پروتئین، چربی کل و کربوهیدرات در ایزوله های مختلف خالص شده در این پروژه متفاوت بود. میزان پروتئین در ایزوله های خالص شده در پروژه حاضر بین ۲۷-۴۰٪ کربوهیدرات بین ۲۱-۲٪ و چربی کل بین ۸-۱۳٪ متغیر بود (شکل ۱۰۰). بررسی ۴۰ میکروالگ که دارای پتانسیل غذایی استفاده در آبرزی پروری در استرالیا بودند نشان داد که دامنه تغییرات پروتئین ۵۲-۶٪، کربوهیدرات بین ۲۳-۵٪ و چربی کل ۲۳-۷٪ بودند این میکروالگها متعلق به گروه های مختلف الگها از جمله دیاتومه ها، یوماستیگو فیتا، کریپتومونادها، کلروفیتا و ردو فیتا بودند (Brown et al., 1997). والکمن و براون (۲۰۰۵) میزان پروتئین را در چندین گونه میکروالگ بین ۳۰-۴۰ درصد کل وزن خشک، کربوهیدرات را بین ۱۵-۵ درصد و چربی کل را بین ۱۰-۲۰٪ وزن خشک آنها تعیین کردند. Martinez-Fernandez et al. در سال ۲۰۰۶ بررسی که بر روی ۷ گونه میکروالگ متعلق به جنسهای ایزوکرایسیس، میکروموناس، کیتوسروس و پاولووا (Pavlova) انجام دادند مقدار پروتئین را ۴۳-۶۳٪ کربوهیدرات را بین ۵-۱ درصد و چربی کل را بین ۱۰-۳۰٪ وزن خشک آنها تعیین کردند.



شکل ۱۰۰: مقایسه درصد پروتئین، چربی و کربوهیدرات در گونه های جدا شده از سواحل چابهار

لازم به ذکر است آنها در بررسی شان شرایط رشد میکرو الگها را کاملاً بهینه نمودند که بتوانند ایزوله هایی با بیشترین مقدار پروتئین داشته باشند. در گونه هایی از سیانو باکتریها توانستند با تغییر در روش استخراج چربی کل بدو خشک کردن آنها و با استفاده از روش دای متیل اتر (DME) چربی کل را اندازه گیری کردند که بین ۴۰-۱۰ درصد وزن خشک آنها تعیین گردید. (Kanda et al., 2012) گونه هایی که کربوهیدرات بالایی دارند رشد جونیل اویستر، ولارو اسکالپ را می توانند بسیار تسریع کنند (Enright et al. 1986). در پروژه حاضر *D. bardawil* دارای بالاترین میزان کربوهیدرات به مقدار $< 21\%$ بود. گونه هایی که میزان پروتئین بالا دارند رشد جونیل ماسلها را تسریع می کند (kenucky et al., 2002). در پروژه حاضر بیشترین میزان پروتئین را گونه دونالیا بارداول و گونه *Synechococcus sp* داشتند $< 40\%$. با توجه مقایسه هایی که بر روی گونه های میکرو الگ و ایزوله های مختلف ایرانی در پروژه حاضر انجام شد میزان پروتئین و چربی و کربوهیدرات ایزوله

های ایرانی در دامنه میزان مشابه با گونه های مختلفی که مناسب استفاده در ایزی پروری هستند و در گزارشات مختلف به آنها اشاره شده است، قرار می گیرند

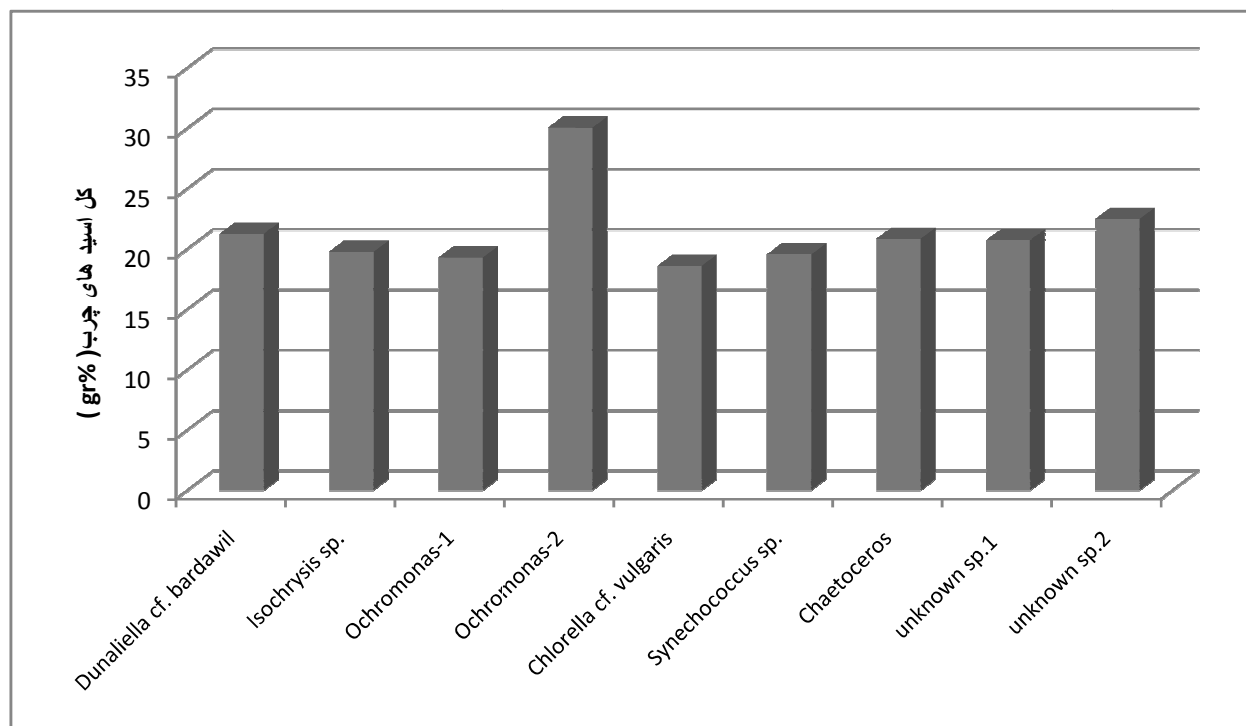
(Brown and jeffrey 1992; Thinh et al. 1999; Volkman and Brown 2005). لازم به ذکر است گونه های خالص شده در این پروژه تحت شرایط معمولی کشت داده شدند و مورد ارزیابی غذایی قرار گرفتند و هیچگونه شرایط بهینه ای به منظور بالا بردن ارزش غذایی آنها مد نظر قرار نگرفت و کلیه ترکیبات شیمیایی میکروالگها در این پروژه خام یا Gross chemical composition هستند.

میزان و نوع هر نوع اسید چرب از فاکتورهای مهم در رشد آبزیان مختلف است (Fernandez et al., 2006). میزان اسیدهای چرب در گروههای مختلف میکرو آلگها و حتی در بین گونه های مشابه متعلق به یک رده ممکن است تفاوت قابل ملاحظه ای را نشان دهند (Brown et al. 1997; Valenzuela-Espinoza et al., 2002)

مقایسه کل اسیدهای چرب استرینهای جدا شده از چابهار نشان داد که از بین گونه های جدا شده گونه اکروموناتس ایزوله دوم دارای بالاترین میزان کل اسید چرب هستند وبعد گونه ناشناخته ۲ دارای میزان بالایی از کل اسید های چرب است (شکل ۱۰۱). در بین ایزوله های چابهار دونا لیلیا دارای بالاترین میزان اسید چرب اشباع شده می باشد به طوریکه بیش از ۴۳ درصد از کل اسیدهای چرب را دارا می باشد (شکل ۱۰۲) معمولاً فلاژلا داران قهوه ای-طلایی میزان اسید چرب اشباع بالاتری از نوع به خصوص اسید پالمیتیک (۱۶:۰) نسبت به بقیه اسیدهای چرب اشباع دارند (Fernandez et al., 2006). میزان اسید چرب اشباع شده در کلرلا ولگاریس در این پروژه $< 38\%$ اسیدهای چرب اشباع شده را داشت. در گونه کلرلا Clorella sp. میزان کل اسید چرب اشباع شده $< 15\%$ گزارش شده است (Pratoomyot et al., 2005) در همین گزارش برای

گونه *Synechococcus sp.* ۴۰.۴۸٪ گزارش شده در حالیکه ایزوله ایرانی این گونه دارای ۲۵٪ اسید چرب

اشباع می باشد.



شکل ۱۰۱: مقایسه درصد کل اسیدهای چرب در گونه هایی که در این پروژه به حجم بالا رسیده اند.

در این پروژه میزان اسید پالمیتیک در گونه ایزوکرایسیس ۲۷ درصد از کل ۳۱ درصد اسیدچرب اشباع شده

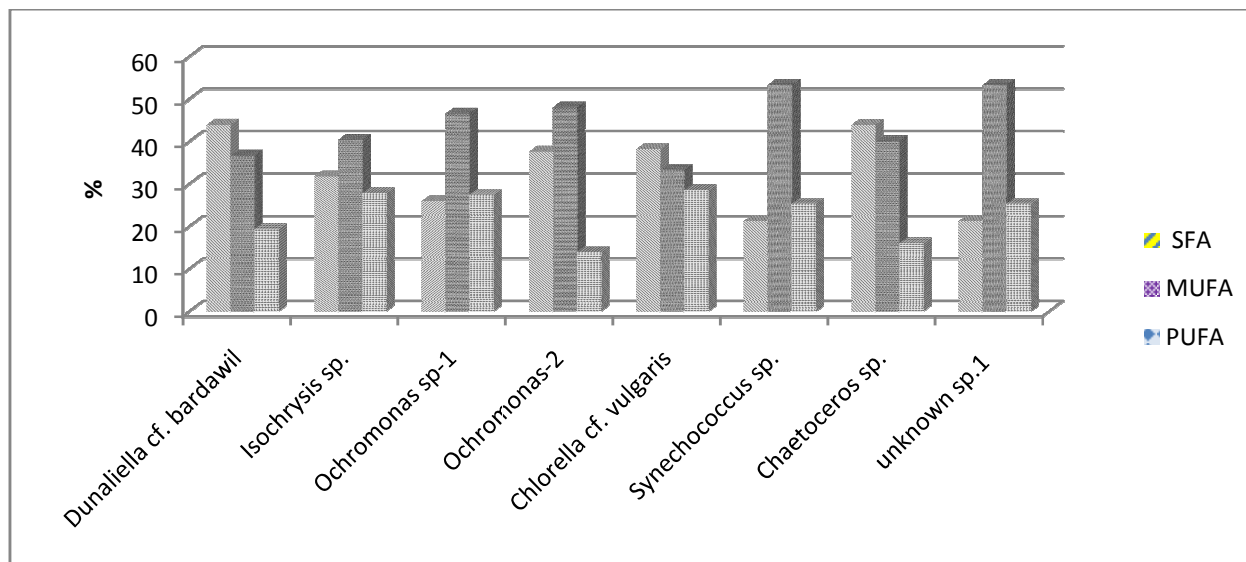
را به خود اختصاص داد. ایزوله چابهارى کلرلا ولگاریس هم میزان اسید پالمیتیک بالاتری نسبت به بقیه

اسیدهای چرب غیر اشباع داشت به طوری که ۳۳٪ از کل ۳۸٪ اسیدچرب غیر اشباع را به خود اختصاص داد

(شکل ۱۰۲). (Ottles and Pires (2001) میزان اسیدهای چرب اشباع شده را برای گونه ولگاریس ۲۵٪ از کل

اسیدهای چرب گزارش دادند.

از بین اسیدهای چرب اشباع شده کلروفیتا معمولاً بیشترین آنها در گونه های کلرلا مربوط به اسید پالمیتیک است. (Volkman et al., 1989 ; Thompson et al., 1990) بین نرخ رشد لارو پکتن و میزان بالای اسید چرب اشباع میکروالگهای مورد استفاده در تغذیه آنها همبستگی مثبت معنی داری وجود دارد (Leonardos and Lusas 2000).



شکل ۱۰۲: مقایسه سه گروه از اسیدهای چرب اشباع شده و اشباع نشده با یک پیوند دو گانه و اشباع نشده با چند پیوند دو گانه در گونه های خالص شده و به حجم بالا رسیده در این پروژه

MUFA_s برای گونه *Synechococcus sp.* ۳۶.۶٪ و گونه ای از جنس کلرولا ۸٪ گزارش شده است (Pratoomyot et al. 2005)

و اما ایزوله ایرانی گونه *Synechococcus sp.* ۵۳٪ و گونه کلرلا ولگاریس ۳۳٪ از اسیدهای چرب غیر اشباع با یک پیوند دو گانه را دارد. MUFA_s برای گونه کلرلا ولگاریس ۲۸٪ اکل اسیدهای چرب را به خود اختصاص داد (Ottles and Pires 2001). در بین همه استرین های ایرانی در این پروژه اسید چرب غالب در گروه MUFA_s اسید لینولئیک (LA) بود و بالا ترین میزان در بین این گروه از اسیدهای چرب را به خود اختصاص

دادند. این اسید از اسیدهای اصلی و دارای درصد بالادر بین این گروه از اسیدهای چرب برای بسیاری از گونه ها از جمله دونالیا تتراسلمیس و کلرولا توسط بسیاری از محققین معرفی شده است (Akman et al. 1968; Renaud et al. 1994)

انواع اسیدهای چرب غیر اشباع با چند پیوند دو گانه $PUFA_s$ موجود در ریز جلبکها نقش مهمی در تعیین ارزش غذایی یک گونه دارد هر چه موجود در این گروه از اسیدهای چرب غنی باشد از نظر تغذیه ای با ارزش خواهد بود. این گروه از اسیدهای چرب برای رشد مراحل لاروی ماهی ، سخت پوستان و نرمتنان ضروری است و کمبود آنها سبب کاهش درصد بقا خواهد شد. (Becker 2004; Brown 2002). در بین این گروه از اسیدهای چرب اسید دکوزاهگزا نوئیک (DHA)، اسید ایکوزاپنتانوئیک (EPA) و اسید ارشیدونیک (AA) از اسیدهای بسیار ضروری در رشد مراحل لاروی آبزیان دارد (Sergeant et al., 1997; Valkman et al. 1993)

در بین گونه های چابهای میزان اسیدهای چرب غیر اشباع با بیش از یک پیوند دو گانه از ۲۸-۱۰٪ متغیر بود به طوریکه گونه کلرولا دارای بالاترین $PUFA$ است. ۳۸٪ از این گروه از اسیدهای چرب برای گونه ولگاریس توسط Otles and Pire در سال ۲۰۰۱ گزارش گردید. بیشترین میزان DHA در بین گونه های ایرانی مربوط به گونه کلرولا ولگاریس با میزان ۳٪ از کل اسیدهای چرب و ۱۵.۵٪ از کل اسیدهای چرب $PUFA$ را شامل شد. برای همین گونه میزان ۰.۳٪ DHA از کل اسیدهای چرب توسط Otles and Pire در سال ۲۰۰۱ گزارش شده است که به نظر می رسد ایزوله ایرانی دارای ارزش غذایی بالایی نسبت به گونه مشابه تجاری دارد. کریپتوموناد ها که معمولا در میزان DHA غنی هستند که به میزان ۱۱-۰.۲٪ از کل اسیدهای چرب آنها را تشکیل می دهد (Brown et al. 1997).

از نظر میزان AA گونه کیتوسروس دارای بالاترین مقدار به طوریکه ۴٪ از کل اسیدهای چرب و ۱۹٪ از PUFA را به خود اختصاص داده است. برای گونه های دیاتومه میزان اسید ارشیدونیک را ۴-۰٪ از کل اسیدهای چرب گزارش دادند (Brown 2002).

C18: 2(n-6) و C18: 3(n-3) هم از اسیدهای چرب PUFA مهم هستند که برای لارو ماهیان به خصوص ماهیات رودخانه ای ضروری هستند و اغلب میکروالگها به جز دیاتومه ها و یوماستیگوفیتها مقادیر قابل توجهی از این نوع اسیدهای چرب را دارا هستند (Dunestan et al. 1994; Castel et al. 1986). در این پروژه میزان اسید چرب C18: 2(n-6) در بین PUFA بیشترین درصد را دارد که بین ۹-۱۵.۵٪ (از کل اسیدهای چرب) تغییر می کند و کیتوسروس از دیاتومه ها دارای کمترین میزان (۹٪) از این نوع اسید چرب است. در بررسی ترکیب ۱۰ گونه میکروالگ میزان این نو از اسیدهای چرب غیر اشباع بین ۴-۱۷.۵٪ گزارش شد که گونه ای از کلرولا دارای بالاترین میزان این نوع اسید (لینولئیک) چرب بود گونه کلرولا ایزوله ایرانی ۱۱.۵٪ از کل اسیدهای چرب آنرا تشکیل می دهد. Otles and Pire در بررسی شان میزان اسید لینولئیک را در گونه کلرولا ولگاریس ۱۱.۴۸٪ از کل اسیدهای چرب گزارش دادند. Rancarati (2004) میزان این نوع اسید چرب را ۱۶٪ برای گونه نانوکلوپسیس و ۵.۵٪ برای گونه ایزوکرایسیس گزارش دادند. در این پروژه میزان آن در گونه ایزوکرایسیس ۱۵٪ از کل اسیدهای چرب تعیین گردید.

اسیدهای چرب میکروالگها هم مانند دیگر ترکیبات بیوشیمیایی تحت تاثیر شرایط کشت و زمان برداشت آنها تغییر می کند (Bown et al. 1997).

۵- نتیجه گیری

انواع ریز جلبک‌هایی که در این پروژه برای اولین بار از آب‌های جنوبی کشور جدا سازی و خالص و شناسایی گردید به عنوان گونه های بومی دارای پتانسیل غذایی مناسب و استفاده در آبرزی پروری معرفی می گردند. گونه هایی که شناسایی شدند ولی به حجم انبوه نرسیدند می توانند در بانک فیتوپلانکتونی به منظور مطالعات بیشتر نگهداری شوند. بعضی از این گونه ها مانند *Cylindrotheca closterium* یا آمفورا که در این پروژه شناسایی مولکولی گردیدند ولی پتانسیل غذایی آنها بررسی نگردید هم دارای پتانسیل استفاده در تکثیر و پرورش هستند. Junior et al. 2007 نشان دادند که این گونه دارای پروتئین، کربوهیدرات و کلروفیل بالایی نسبت به گونه های کیتوسروس گراسیلیس و تتراسلمیس است و دارای پتانسیل غذایی مناسب برای بعضی گونه ها است.

میکروآلگها حتی اگر تحت شرایط استاندارد کشت داده شوند دارای مقادیر متغیری از ترکیبات پروتئین، کربوهیدرات، چربی و اسیدهای چرب هستند. این ترکیبات در بین ایزوله های ایرانی متفاوت هستند. میزان ترکیبات بیوشیمیایی اندازه گیری شده در گونه های چابهار (Gross chemical composition) تحت شرایط نرمال بوه و هیچگونه تغییری به برای بهینه نمودن شرایط کشت به منظور بالا بردن پتانسیل غذایی آنها مد نظر قرار نگرفت. مقادیر این ترکیبات اندازه گیری شده در ایزوله های ایرانی در دامنه نرمال و گاهی مناسب تر از گونه های مشابه که در گزارشات از دیگر نقاط ساحلی دنیا ذکر گردیده، می باشد. به بهینه نمودن شرایط کشت مقادیر این ترکیبات به طور قابل ملاحظه ای می تواند تغییر کند.

DHA و AA از انواع اسیدهای چرب اشباع نشده PUFA که برای بسیار از آبزیان ضروری می باشد در ایزوله های ایرانی با مقادیر مناسب وجود دارد. در بین ایزوله های چابهار گونه کلرولا ولگاریش دارای ویتامین تیامین (B1) و نیاسین (B3) بالاتری و اکرومونات و ویتامین پیرووکسین (B6) بالایی دارد.

۶- پیشنهادات

۱. ادامه جدا سازی و خالص سازی گونه های بومی از آبهای جنوبی کشور
۲. اختصاص دادن محلی یا مرکزی خاص در جنوب کشور (چابهار) برای ایجاد و توسعه بانک فیتوپلانکتونی و نگهداری گونه های بومی تحت شرایط استاندارد
۳. نگهداری و انتقال و همه گونه های دریایی خالص شده به بانک فیتوپلانکتونی جنوب کشور
۴. بررسی جنبه های کاربردی گونه های بومی
۵. شناسایی گونه ای دقیق گونه های بومی با استفاده از میکروسکوپ نوری الکترونی گدازه و گذاره و شناسایی مولکولی گونه ها
۶. ایجاد بانک فیتوپلانکتهای دارای سایز های بزرگتر و داینوفلاژلاها

عربی نژاد عبدالحلیم، سیامر، ۱۳۷۵، جداسازی اسکلتونما از خلیج آبهای فارس (بوشهر). گزارش نهایی مرکز تحقیقات شیلات.

- Ackman, R. G., C. S. Tocher and J. McLachlan (1968). "Marine phytoplankton fatty acids." J. Fish. Res. Board Canada 25: 1603-1620.
- Andersen, R. (2011). "*Ochromonas moestrupii* sp. nov. (Chrysophyceae), a new golden flagellate from Australia." Phycologia 50(6): 600-607.
- Attaran-Fariman, G. and C. Bolch (2007). "Scrippsiella irregularis sp. nov. (Dinophyceae), a new dinoflagellate from the southeast coast of Iran,." Phycol 46(5): 572-582.
- Attaran-Fariman, G. (2007). Dinoflagellate cysts and Chattonella resting stages from recent sediments of the southeast coast of Iran, University of Tasmania, Australia, PhD Thesis: 318.
- Badger, M. R. and G. D. Price (1994). "The role of carbonic anhydrase in photosynthesis. A. Rev. Plant Physiol." Plant Mol. Biol 45: 369-392.
- Blanchemain, A. and D. Grizeau (1999). "Increased production of eicosapentaenoic acid by *Skeletonema costatum* cells after decantation at low temperature." Biotechnol Tech 13: 497-501.
- Bolch, C. J. S., P. Orr, G. J. Jones and S. J. Blackburn (1999). "Genetic, morphological and toxicological variation among globally distributed strains of *Nodularia* (Cyanobacteria)." J. Phycol. 35: 339-355.
- Bolch, C. J. S., S. J. Blackburn, G. M. Hallegraeff, R. E. Vaillancourt and . (1999b). "Genetic variation among strains of the toxic dinoflagellate *Gymnodinium catenatum* (Dinophyceae)." J. Phycol. , 35: 356-367.
- Brown, M. and R. Robert (2002). "Preparation and assessment of microalgal concentrates as feeds for larval and juvenile Pacific oyster (*Crassostrea gigas*)." Journal of Phycology 37: 968-974.
- Brown, M. R., S. W. Jeffrey, J. K. Volkman and G. A. Dunstan (1997). "Nutritional properties of microalgae for mariculture." Aquaculture 151: 315-331.
- Brown, M. R. (1991). "The amino acid and sugar composition of 16 species of microalgae used in mariculture." J. Exp. Mar. Biol. Ecol 145: 79-99.
- Brown, M. R. and S. W. Jeffrey (1992). "Biochemical composition of microalgae from the classes Chlorophyceae and Prasinophyceae. 1. Amino acids, sugars and pigments." J. Exp. Mar. Biol. Ecol 161: 91-113.
- Brown, M. R., G. A. Dunstan, S. W. Jeffrey, J. K. Volkman, S. M. Barrett and J. M. LeRoi (1993). "The influence of irradiance on the biochemical composition of the prymnesiophyte *Isochrysis* sp. (clone T-ISO)." J. Phycol. 29: 601-612.
- Brown, M. R. and C. Farmer (1994). "Riboflavin content of six species of microalgae used in mariculture." J. Appl. Phycol 6: 61-65.
- Brown, M. R., G. A. Dunstan, S. J. Norwood and K. A. Miller (1996). "Effects of harvest stage and light on the biochemical composition of the diatom *Thalassiosira pseudonana*." J. Phycol. 32: 64-73.
- Brown, M. R., S. W. Jeffrey, J. K. Volkman and G. A. Dunstan (1997). "Nutritional properties of microalgae for mariculture." Aquaculture 151 (1997) 315-331 151: 315-331.
- Brrown, M., I. Mular, C. Miller, C. Farmer and C. Trenerry (1999). "Vitamin content of microalgae used in aquaculture." J. of applied phycology 11(3): 247-257.
- Brune, D. E., S. Reed, G. Schwartz and J. Collier (2002). "High rate algal systems for aquaculture. Abstract the 1st Congress of the International Society for Applied Phycology, Aquadulce, Roquetas de Mar, Almeria (Spain). 26-30 May 2002."
- Caron, D. A., E. L. Lim and G. Miceli (1991). "cyanobacteria and heterotrophic bacteria by protozoa in laboratory cultures and a coastal plankton community." Mar. Eco. Prog. Ser. 76: 205-212.
- Castell, J. D., D. E. Conklin, C. J. S., S. P. Lall and K. Norman-Boudrin (1986). "Aquaculture nutrition. In Realism in aquaculture: achievements, constraints, perspectives. Review papers from World Conference on Aquaculture, Venice, Italy, 21-25 September 1981, European Aquaculture Society,

- Bredene, Belgium pp. 251–308."
- Doyle, J. and L. Doyle (1987.). "A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue." *Phytochem. Bull.* 19: 11-15.
- Enright, C. T., G. F. Newkirk, J. S. Craigie, J. D. Castell and b. L. (1986). "Evaluation of phytoplankton as diets for juvenile *Ostrea edulis*." *Marine Biology and Ecology* 96: 1-13.
- Fountoulaki, I. T. E., N. Dolapsakis, I. Kotzamanis, I. N. Bitis, Y. Cladas and A. Economou-AmJ (2009). "Screening for marine nanoplanktic microalgae from Greek coastal lagoons." *ApplPhyco* 21: 457-469.
- Gao, K. and A. Hongxia (2004). "RELATIONSHIP OF GROWTH AND PHOTOSYNTHESIS WITH COLONY SIZE IN AN EDIBLE CYANOBACTERIUM, GE-XIAN-MI NOSTOC (CYANOPHYCEAE)." *J. Phycol.* 40: 523-526.
- González, M., A. W. Coleman, P. Gómez and R. Montoya (2001). "Phylogenetic relationship among various strains of *Dunaliella*(Chlorophyceae) based on nuclear ITS rDNA sequences." *J. Phycol.* 37: 604-611.
- GUGLIELMI, G., R. RIPPKA and N. TANDEAU DE MARSAC (1993). "Main properties that justify the different taxonomic position of *Spirulina* sp. and *Arthrospira* sp. among cyanobacteria. In: Doumenge, F., Durand-Chastel, H., Toulemont, A., Eds. *Spiruline algue de vie*. Bulletin de l'Institut Océanographique Monaco. Musée Océanographique. Numéro spécial 12:13-23."
- Guil-Guerrero, J. L., R. Navarro-Juárez, J. C. López-Martínez, P. Campra-Madrid and M. M. Reboloso-Fuentes (2004). "Functional properties of the biomass of three microalgal species." *J. Food Eng* 65: 511-517.
- Guil-Guerrero, J. L., R. Navarro-Juárez, J. C. López-Martínez, P. Campra-Madrid and M. M. Reboloso-Fuentes (2004). "Functional properties of the biomass of three microalgal species."
- Guillard, R. (1975). "Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. pp 29-60. In WL Smith, MH Chaney (eds), *Culture of Marine Invertebrate Animals*. Plenum Press, New York."
- Hai-Tao, L., G. YANG, X. ZHANG and J. ZHANG (2007). "Isolation of *Cylindrothecaclosterium* and Its Morphological and Molecular Identifications." *Marine Life Sciences*: 7-13.
- Harrison, P. J., P. A. Thompson and G. S. Calderwood (1990). "Effects of nutrient and light limitation on the biochemical composition of phytoplankton." *Journal of Applied Phycology* 2: 45-56.
- Hibberd, D. J. (1970). "Observations on the cytology and ultrastructure of *Ochromonas tuberculatus* sp. nov (Chrysophyceae), with special reference to the discobolocysts." *British Phycological Journal* 5(2): 119-143.
- Hicks, R. E., R. I. Amann and D. A. Stahl (1992). "Combination of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed microbial populations." *Appl. Environ. Microbial.* 58(11): 3694–3700.
- Hiramatsu, S., M. Fujie, S. Usami, K. Sakai and T. Yamada (2000). "Two catalytic domains of *Chlorella* virus CVK2 chitinase." *T. J. Biosci. Bioeng.* 89: 252-257.
- Honda, D., A. Yokota and J. Sugiyama (1999). "Detection of seven major evolutionary lineages in Cyanobacteria based on the 16S rRNA gene sequence analysis with new sequences of marine *Synechococcus* strains." *J Mol Evol.* 48: 723-739.
- Jeffrey, S. W., J.-M. LeRoi and M. R. Brown (1991). Characteristics of microalgal species for Australian mariculture. *Proceedings of the National Aquaculture, NSW Australia*,.
- Kacka, A. and G. Donmez (2008). "Isolation of *Dunaliella* spp. from a hypersaline lake and their ability to accumulate glycerol." *Bioresource Technology* 99: 8348-8352.
- KAIN, J. M. and G. E. Fooo "Studies on the growth of marine phytoplankton *Prorocentrum micans* Ehrenberg." *mar. biol. Ass. U.K.* 39: 33-50.
- Kanda, H., P. Li, T. Ikehara and M. Yasumoto-Hirose (2012). "Lipids extracted from several species of natural blue-green microalgae by dimethyl ether: Extraction yield and properties." *Fuel* 95: 88-92.
- Kawamura, T., R. D. Roberts and C. M. Nicholson (1988). "Factors affecting the food value of diatom strains for post-larval abalone *Haliotis iris*." *Aquaculture* 160: 81-88.
- KINGSTON, M. B. (2009). "GROWTH AND MOTILITY OF THE DIATOM CYLINDROTHECA CLOSTERIUM: IMPLICATIONS FOR COMMERCIAL APPLICATIONS." *Journal of the North Carolina Academy of Science* 125(4): 138-142.
- Knuckey, R. M. (1998). "Australian microalgae and microalgal concentrates for use as aquaculture feeds.

- Ph.D. Thesis. University of Tasmania, 254 pp."
- Kotaki, Y., K. Koike, M. Yoshida, C. V. Thuoc, N. T. M. Huyen, N. C. Hoi, Y. Fukuyo and M. Kodama (2000). "Domoic acid production of *Nitzschia* sp., isolated from a shrimp-culture pond in Do Son, Vietnam." *J. Phycol.* 36: 1057-1060.
- Krienitz, L., C. Bock, W. Luo and T. Pröschold (2010). "Polyphyletic origin of the Dictyosphaerium-morphotype within Chlorellaceae (Trebouxiophyceae)." *J. Phycol.* 46: 559-563.
- Laws, E. A., B. N. Popp, R. R. Bidigare, M. C. Kennicutt and S. A. Macko (1995). "Dependence of phytoplankton carbon isotope composition on growth rate and [CO₂]: theoretical considerations and experimental results." *Acta* 59: 1131-1138.
- Li, S., P. Kehou, B. Zhu, X. Ma, X. Liang and G. YANG (2011). "Molecular identification of a species in genus *Nannochloropsis*." *Journal of Ocean University of China* 10(4): 391-396.
- Lin, D. S., A. M. Ilias, W. E. Connor, R. S. Caldwell, H. T. Cory and G. D. Dave (1982). "Composition and biosynthesis of sterols in selected marine phytoplankton. *Lipids*." *Lipids* 17: 818-824.
- Lopes-Muñoz, I., J. Abalde and C. Hererro (1992). "Crecimiento y contenido de pigmentos de cuatro especies de microalgas marinas cultivadas com diferentes temperaturas e intensidades de luz." *Cient. Comp.* 3: 59-65.
- Lundholm, N. and Ø. Moestrup (2000). "MORPHOLOGY OF THE MARINE DIATOM *NITZSCHIA NAVIS-VARINGICA*, SP. NOV. (BACILLARIOPHYCEAE), ANOTHER PRODUCER OF THE NEUROTOXIN DOMOIC ACID." *J. Phycol.* 36: 1162-1174.
- Muller-Feuga, A. (2000). "The role of microalgae in aquaculture: situation and trends." *J. Appl. Phycol.* 12(3/5)(3/5): 527-34.
- Muller-Feuga, A., R. Kaas and J. Moal (2003). "The microalgae of aquaculture. In: Live feeds in Marine aquaculture (eds J. Stottrup & L. McEvoy), Blackwell Science Publishers." 207-52.
- Muller-Feuga, A., R. Robert, C. Chantal, J. Robin and P. Divanach (2003b). "The uses of microalgae in aquaculture. In: Live feeds in Marine aquaculture (eds J. Stottrup & L. McEvoy), Blackwell Science Publishers,." pp. 253-99.
- Pauline, S., C. Joannis-Cassan, E. Duran and A. Isamber (2006). "Commercial Applications of Microalgae." *JOURNAL OF BIOSCIENCE AND BIOENGINEERING* 101(2): 87-96.
- Ponisa, E., c. I. Probert, B. Véronb, C. Le, J. R. Mathieu and R. Robert (1999). "Nutritional value of six Pavlovophyceae for Crassostreagigas and Pectenmaximuslarvae." *Aquaculture* 170: .147-159.
- Rao, D. V. S., Y. Pan and F. Al-Yamani (2005). "Growth and photosynthetic rates of Chlamydomonas plethora and Nitzschia frustula cultures isolated from Kuwait Bay, Arabian Gulf, and their potential as live algal food for tropical mariculture." *Mar. Ecol.* 26(1): 71-79.
- Reinke, D. C. (2007). "ULTRASTRUCTURE OF *CHAETOCEROS MUELLERI* (BACILLARIOPHYCEAE): AUXOSPORE, RESTING SPORE AND VEGETATIVE CELL MORPHOLOGY." *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 23(2): 153-155.
- Renaud, S. M., L. V. Thinh and D. L. Parry (1999). "The gross composition and fatty acid composition of 18 species of tropical Australian microalgae for possible use in mariculture." *Aquaculture* 170: 147-159.
- Renaud, S. M. and D. L. Parry (1994). "Microalgae for use in tropical aquaculture. Effect of salinity on growth, gross chemical composition and fatty acid composition of three species of marine microalgae." *J. Appl. Phycol.* 6: 347-356.
- Renaud, S. M., D. L. Parry and L.-V. Thinh (1994b). "Microalgae for use in tropical aquaculture. Gross chemical and fatty acid composition of twelve species of microalgae from the Northern Territory, Australia." *J. Appl. Phycol.* 6: 337-345.
- Renaud, S. M., L. V. Thinh, G. Lambrinidis and D. L. Parry (2002). "Effect of temperature on growth, chemical composition and fatty acid composition of tropical microalgae grown in batch cultures." *Aquaculture* 211: 195-214.
- Richmond, A. (2005). Microalgae of economic potential. In: Richmond A, editor. CRC handbook of microalgal mass culture. Boca Raton: CRC Press;p. 199- 243.
- Rippka, R., J. Deruelles, J. B. Waterbury, M. Herdman and R. Y. Stanier (1979). "Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria." *J Gen Microbiol* 111, 111: 20-31.
- ROBERTS, R. D., T. KAWAMURA and C. M. HANDLEY (2007). "Factors affecting settlement of abalone (*Haliotis iris*) larvae on benthic diatom films." *J. Shellish Res.* 26(2): 323-334.
- Sa´nchez, M. n. A., A. Contreras Go´mez, F. Garcý´ Camacho, E. Molina Grima and Y. Chisti (1999). "Comparative evaluation of compact photobioreactors for large-scale monoculture of microalgae." *J*

- Biotechnol 70: 249–70.
- Sorhannus, U., F. F. Gasse, R. Perasso and B. A. (1995). "A preliminary phylogeny of diatoms based on 28S ribosomal RNA sequence data." *Phycologia* 34(1): 65-73.
- Soudant, P., M. Val Sanles, C. Quere, J. R. Le Coz, M. Y., J. Moal, S. F. and P. Sorgeloos (2000). "The use of lipid emulsions for sterol supplementation of spat of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*." *Aquaculture* 184: 315-326.
- Sournia, A., Ed. (1978). *Phytoplankton manual*. Monogr.Oceanogr. Methods, UNESCO.
- Tempesta, S., M. Paoletti and M. Pasqualetti (2010). "Morphological and molecular identification of a strain of the unicellular green alga *Dunaliellasp.* isolated from Tarquinia Salterns." *Transitional Waters Bulletin TWB, Transit. Waters Bull* 4(2): 60-70.
- Thimijan, R. and D. Royal (1982). "Photometric, Radiometric, and Quantum Light Units of Measure: A Review of Procedures for Interconversion." *HortScience* 18: 818-822.
- Urbania, R., E. Magalettib, P. Sista and A. M. Cicero (2005). "Extracellular carbohydrates released by the marine diatoms *Cylindrotheca closterium*, *Thalassiosira pseudonana* and *Skeletonema costatum*: Effect of P-depletion and growth status." *Science of the Total Environment* 353: 300- 308.
- Volkman, J. K., Malcolm R. Brown, G. A. Dunstan and S. W. Jeffrey (2008). "THE BIOCHEMICAL COMPOSITION OF MARINE MICROALGAE FROM THE CLASS EUSTIGMATOPHYCEAE." Article first published online.
- Volkman, J. K., M. R. Brown, G. A. Dunstan and S. W. Jeffrey (1993). "The biochemical composition of marine microalgae from the class Eustigmatophyceae." *Journal of Phycology* 29: 69-78.
- Winters, K., R. Odonnel, J. C. Betterton and C. Van Bealen (1976). "Water-Soluble Components of Four Fuel Oils: Chemical. Characterization and Effects on Growth of Microalgae." *marine Biology* 36: 269-276.
- Yu, Y., B. Chen and Y. Wenlang (1998). "Identification of the alga known as *Nannochloropsis* Z-1 isolated from a prawn farm in Hainan, China as *Chlorella*." *Protist* 149: 61-74.
- Zhou, R., Z. Sun, Y. Zhen and H. Liu (1990). "PRELIMINARY REPORT ON THE ISOLATION, CULTURE AND USE FOR *Isochrysisgalbana*." *Transactions of Oceanology and Limnology* 25: 1-10.

Identification of Local Microalgae & their Evaluation as Live Food in Aquaculture from Oman Sea.

Abstract

Microalgae are very important organisms in aquaculture as major live food in all growth stages of bivalve, some larval stages of crustaceans, some fishes and zooplankton. In this project with the knowledge that local algae can provide better nutritional balance for local animals. Microalgae were isolated, identified and evaluated for their nutritional value for the first time. Another aim of this research was to create phytoplankton culture collection (Bank) in the south of Iran. Water was sampled from Sistan and Baluchesta coasts, then isolation and purification process were carried out in the lab. Species identification was based on morphology and molecular analyses. rDNA was extracted from each strain after PCR, partial LSU-rDNA region were sequenced and compared with similar sequence from GenBank. In order to evaluate their nutritional properties, relative growth, fatty acids composition, total lipid, carbohydrate, protein, and some vitamins of each purified strain were determined. Totally 25 species were isolated and purified, of which 12 strains were recorded in GenBank and their nutritional potential were assessed. *Dunaliella cf. bardawill*, *Isochrysis sp.* *Cheatoceros sp.* *Clorella cf. vulgaris*, *Ochromonas sp.* and *Synechococcus sp.* were the most important species research. Iranian strains were varied in their amount of protein (27-40%), carbohydrate (2-21%) and lipid (8-13%). Proportions of SFA (21-48%), MUFA (33-53%) and PUFA (11-28.5%) were varied among strains. The highest amount of PUFA and B3 vitamin were found in *Clorella cf. vulgaris*. The highest content of protein (40.12% dry wt) and total fatty acid concentration (30% dry wt) were found in *Dunaliella cf. bardawil* and *Ochromonas* strain(CHPO2) respectively. The maximum content of total fatty acid was observed in *Ochromonas sp.* (CHPO2). *Cheatoceros sp.* had higher relative growth rate in comparison with other species